



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Caracterización microbiológica, física y química
del pulque producido en el estado de Querétaro”

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta

Q.A. Marco Antonio Verduzco Tornel

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Querétaro, Qro. A 15 de noviembre de 2024.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

“Caracterización microbiológica, física y química del pulque producido
en el estado de Querétaro”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta

Q.A. Marco Antonio Verduzco Tornel

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano.

Presidente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar.

Secretario

Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja.

Vocal

Dr. José Adelfo Escalante Lozada.

Suplente

Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde.

Suplente

Centro Universitario, Qro.

Noviembre 2024

México

Dedicatorias

- A mis papás, Verónica y Marco Antonio, por darme la vida, por darme la oportunidad de escribir mi propia historia, por guiarme con su luz, por enseñarme lo que el amor, la entrega, el compromiso y la bondad significan, por siempre creer en mí. A mis hermanos, José David y Verónica Montserrat, por darme su amor, su tolerancia, sus ocurrencias, su luz, su entendimiento...por ser ustedes, hoy y siempre. Los amo.
- A Mikoyan, por ser luz, paz y espontaneidad desde que llegaste a mi vida. Eres lo mejor que me ha pasado en la vida. Te amo por siempre.
- A Graciela y José Gabriel. Sé que a pesar de ya no estar aquí, guían mis pasos desde otro lugar con sus enseñanzas, la calidez de su luz y su amor. Los amo y recuerdo por siempre. A Cecilia Guadalupe y David, por cobijarme, por motivarme, por darme su amor y su calidez desde siempre. Los amo.
- A la familia Verduzco Guízar y Tornel López Ortega, por acobijarme con su amor, apoyo y confianza. Este logro es también suyo.
- A Italia, Paloma, Fernando, Valeria y Viridiana. Gracias por darme mil razones para nunca dejar de intentar y por ayudarme a creer en mí cuando más lo necesitaba. Los llevo siempre conmigo, gracias de todo corazón por todo.
- A Memo, Andrei y Kike por las pláticas, los consejos, por las tardes de fútbol. Gracias de todo corazón por todo.
- A Diego, Montse, Marco y Jimena por su confianza, apoyo y escucha. Gracias por todo.
- Al Doctor José Adelfo Escalante Lozada, por su paciencia, entendimiento, amabilidad y complicidad. Gracias por enseñarme un lado de la ciencia que no conocía y por inspirarme a poner mi grano en el mundo del pulque. Gracias por todo.
- A la Doctora Sofía María Arvizu Medrano, por su amabilidad, compromiso, entendimiento y apoyo constante. Gracias por estar e impulsarme en este proyecto siempre.

- A Carmen Iturbe Andreu, Ana Iturbe Andreu y Fabiola Bardales, por confiar y creer en mí. Por enseñarme lo que la paciencia y el liderazgo significan.
- Al Doctor Adrián Gómez Baltazar, por su amabilidad, por darme las herramientas para creer en mí y mejorar y por impulsarme a seguir adelante. Le agradezco profundamente todo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo, confianza en el proyecto y facilidades otorgadas producto de la convocatoria Becas Nacional (Tradicional) 2022-2 Primer Periodo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por su formación y orientación, así como por las facilidades otorgadas para realizar el presente proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología por su valiosa participación en el presente proyecto, por permitir una estancia bajo el concepto de movilidad nacional y por los recursos y orientación otorgados a dicha movilidad.

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada campus Querétaro por su valiosa participación en el presente proyecto y por los recursos y orientación otorgados.

A M.C. Andrei Noguera Gil por su valiosa orientación en el manejo de los datos recolectados, así como por las asesorías en codificación.

Al Doctor José Adelfo Escalante Lozada, Doctor Pedro Alberto Vázquez Landaverde, Doctora Dalia Elizabeth Miranda Castilleja y Doctor Juan Ramiro Pacheco Aguilar por su valiosa orientación y conocimientos y por siempre impulsar el correcto desenvolvimiento de este proyecto.

A Francisco Vega Uribe, Paola Carolina Ahumada Trejo y Armando Villegas en El Lobo, El Marqués, Querétaro; Jorge Guerrero Quintanar y Alfonso Reséndiz en Boyé, Cadereyta de Montes, Querétaro y Simón Patrocinio Guidiño en Charco Frío,

Cadereyta de Montes, Querétaro por su trabajo diario y por abrir sus puertas al presente estudio.

Índice

Resumen:	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	6
2.1 El pulque como bebida ancestral.....	6
2.1.1 Panorama actual del pulque en México y el estado de Querétaro	9
2.2 Agave.....	12
2.2.1 Condiciones climatológicas y geográficas de las regiones productoras de agave del estado de Querétaro.....	13
2.3 Proceso de obtención del pulque.....	15
2.3.1 Castración.....	15
2.3.2 Raspado y extracción del aguamiel	16
2.3.3 Preparación de semilla	18
2.3.4 Fermentación	19
2.4 Propiedades nutritivas y posible funcionalidad del aguamiel y del pulque ...	24
2.5 Microorganismos asociados al pulque	27
2.5.1 Dinámica poblacional microbiana durante la fermentación del pulque ...	34
2.5.2 Microorganismos probióticos.....	41
2.5.3 Microorganismos patógenos	43
2.6 Características sensoriales del pulque	45
2.7 Denominación de origen bajo el esquema legal mexicano	47
3. Objetivos	50
3.1 General.....	50
3.2 Específicos.....	50

4. Material y métodos	51
4.1 Recolección de muestras	51
4.2 Análisis físicos y químicos del aguamiel y pulque recolectado	53
4.2.1 Acidez titulable	53
4.2.2 Contenido de carbohidratos.....	53
4.2.3 Determinación de pH	53
4.2.4 Sólidos solubles totales.....	54
4.2.5 Viscosidad	54
4.2.6 Análisis de compuestos volátiles, etanol y ácido acético.....	56
4.3 Análisis de la calidad microbiológica de aguamiel, semilla y pulque recolectados	58
4.3.1 Bacterias ácido lácticas, coliformes totales y levaduras	58
4.4 Análisis de la diversidad microbiana por medio de secuenciación de siguiente generación de la región ribosomal V3-V4 bacteriana e ITS1-5F fúngica	60
4.4.1 Obtención de poblaciones microbianas del aguamiel y del pulque	60
4.4.2 Extracción de ADN y secuenciación de siguiente generación de los amplicones 16S/ITS.....	60
4.5 Análisis estadístico, bioinformático y visualización de datos.....	61
5. Resultados y discusión	64
5.1 Características de producción en la región de estudio.....	64
5.2. Descripción de la producción en la región.....	67
5.3 Perfil de volátiles.....	91
5.4 Asignación taxonómica	100
5.5. Análisis de diversidad	110
6. Conclusiones	117

7. Referencias.....118
8. Anexos132

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Superficie plantada de agave pulquero en México y la producción de pulque para el año 2023.	9
Cuadro 2. Tipos de suelo de las diferentes regiones productoras de maguey pulquero en Querétaro.	13
Cuadro 3. Temperatura media anual y por temporada de las regiones agaveras.	15
Cuadro 4. Clasificación del aguamiel con base en la NMX-V-022-1972.....	17
Cuadro 5. Clasificación del pulque con base en la NMX-V-037-1972.....	22
Cuadro 6. Principales nutrientes en el aguamiel y sus concentraciones.	24
Cuadro 7. Diversidad microbiana estudiada en distintas regiones productoras de pulque.....	28
Cuadro 8. Microorganismos detectados en distintas etapas de la fermentación de aguamiel para producir pulque.....	38
Cuadro 9. Principales productos de la fermentación del aguamiel y grupos microbianos asociados.....	40
Cuadro 10. Descriptores sensoriales propuestos para caracterizar al pulque.....	46
Cuadro 11. Fecha de muestreo, precipitación, tipo de suelo y especie de Agave asociada a cada estación muestreada para aguamiel, pulque joven e iniciador de la fermentación.	55
Cuadro 12. Técnica y medio de cultivo, volumen de muestra empleado, rango cuantificable y condiciones de incubación para la cuantificación de bacterias ácido lácticas, coliformes totales y hongos y levaduras.	59
Cuadro 13. Temperatura de muestreo para cada matriz y características de fermentación registradas en cada estación de muestreo.....	65
Cuadro 14. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para aguamiel muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.....	69

Cuadro 15. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el iniciador de la fermentación muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.....	71
Cuadro 16. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el pulque joven muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.....	72
Cuadro 17. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre aguamiel muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.....	76
Cuadro 18. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre pulque joven o listo para consumo muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.....	78
Cuadro 19. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre pulque semilla o iniciador de fermentación muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.....	81
Cuadro 20. Índices de diversidad alfa estimados.....	112

Índice de Figuras

Figura 1. Principales estados de México asociados a la presencia de diversas especies de agave y a la producción de pulque.	6
Figura 2. Principales municipios productores de agave pulquero y de pulque marcados con un ícono de agave o maguey pulquero.	10
Figura 3. Publicaciones relacionadas con pulque desde el año 1992 hasta 2022.	11
Figura 4. Producción de pulque y maguey pulquero en México desde 1986 hasta 2023.....	12
Figura 5. Localización de Querétaro y las respectivas instalaciones productoras, marcadas por símbolos de Agave.	52
Figura 6. PCA para aguamiel (PC1=49.5% de varianza explicada y PC2=27.2% de varianza explicada).	83
Figura 7. PCA para pulque joven (PC1=34.5% de varianza explicada y PC2=25.4% de varianza explicada)..	85
Figura 8. PCA para iniciador de la fermentación (PC1=38.3% de varianza explicada y PC2=23.4% de varianza explicada).	86
Figura 9. PCA y agrupamiento por K-medias para aguamiel (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS, en inglés) con 5 centroides=3.60) empleando las Puntuaciones del PCA previo.....	88
Figura 10. PCA y agrupamiento por K-medias para pulque joven (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS) con 5 centroides= 3.51) empleando las Puntuaciones del PCA previo.....	89
Figura 11. PCA y agrupamiento por K-medias para el iniciador de fermentación (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS) con 4 centroides=2.86) empleando las Puntuaciones del PCA previo.....	90
Figura 12. Mapa de calor para los compuestos volátiles del pulque joven..	95
Figura 13. A) PCA para los volátiles detectados en pulque joven (PC1=29.49% de varianza explicada y PC2=16.05% de varianza explicada).. B) Agrupamiento por K-medias para los volátiles de pulque joven (Suma de Cuadrados Intra Clúster	

(WCSS) con 6 centroides=4.74), empleando las puntuaciones generadas en el PCA previo..... 97

Figura 14. Asignación taxonómica bacteriana de las diferentes matrices muestreadas.. 102

Figura 15. Asignación taxonómica fúngica de las diferentes matrices muestreadas. 103

Figura 16. A) Número de grupos microbianos exclusivos y comunes entre aquellos detectados en Hidalgo (Rocha-Arriaga, et al., 2020) y la región queretana de este estudio. **B)** Número de grupos microbianos exclusivos y comunes entre aquellos detectados en Morelos (Astudillo-Melgar et al., 2023) y la región queretana de este estudio.....110

Figura 17. A) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) para bacterias con base al índice de Jaccard para aguamiel. **B)** PCoA fpara bacteria con base al índice de Jaccard para pulque joven. **C)** PCoA para bacteria con base al índice de Jaccard para el iniciador de la fermentación.....114

Figura 18. A) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para aguamiel. **B)** PCoA para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para pulque joven. **C)** PCoA para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para el iniciador de la fermentación.115

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento



Resumen:

El pulque es una bebida alcohólica fermentada tradicional de México, producida del aguamiel de diferentes especies de *Agave*. Cada región productora tiene variaciones en la elaboración que impactan en sus características. Se ha estudiado al pulque en diferentes regiones, pero restringido a algunas localidades o días de producción, limitando el entendimiento de la bebida, desde su origen artesanal y complejo. En este estudio, se analizó pulque de cinco productores de El Marqués y Cadereyta de Montes, Querétaro, muestreando en dos ocasiones durante el verano y tres etapas del proceso: aguamiel (materia prima), iniciador de la fermentación y pulque joven (producto terminado). Se determinaron temperatura, viscosidad, acidez titulable, pH, °Brix, contenido de levaduras, bacterias ácido lácticas y coliformes totales, secuencia de amplicones de regiones ribosomales V3-V4 (bacteriana) e ITS1-5F (fúngica); y exclusivamente en matrices fermentadas: carbohidratos reductores directos, etanol, ácido acético y perfil de volátiles mediante HS SPME-GC-MS. Para el aguamiel, la heterogeneidad observada se puede atribuir a la especie de *Agave* empleada en cada región (pH y viscosidad en el rango de 4.38-8.15 y 1.29-2.28 cP, respectivamente). Aunque existe cierta homogeneidad en el pulque queretano, la etapa de fermentación, especie de *Agave* empleada y la localidad tienen la mayor influencia en las características de la bebida (pH, viscosidad y etanol en el rango de 3.51-4.25, 1.44-2.02 cP y 1.07-2.21% (v/v), respectivamente para pulque joven y 3.51-4.14 y 1.40-1.89 cP para iniciador). El perfil de volátiles del pulque joven es influenciado, principalmente, por la especie de *Agave* y localidad productora; identificándose además trece compuestos siempre presentes (“núcleo de aroma”) en el pulque joven de las regiones muestreadas, principalmente, ésteres, alcoholes superiores y ácidos orgánicos. Para la diversidad microbiana, se encontraron grupos tanto en común (*Lactobacilli*, *Saccharomyces*, *Zymomonas* y *Leuconostoc*, principalmente) como exclusivos (*Fructobacillus*, *Alkanindiges* y *Komagataeibacter*) con otras regiones productoras. A pesar de que cada muestra analizada se puede considerar como única con relación a su microbiota, fue posible proponer “núcleos microbianos regionales”. Esta información constituye la base para esfuerzos futuros en la tarea de categorizar regionalmente la bebida y estandarizarla, conservando su origen artesanal.

Palabras clave: agave, pulque, aguamiel, compuestos volátiles, microbiota.

Abstract:

Pulque is an alcoholic traditional fermented beverage from Mexico, produced from aguamiel obtained from different *Agave* species. Each producing region has variations on its elaboration that impact on the beverage's characteristics. Pulque has been studied in different producing regions but restraining the study to a few localities or producing days, which could limit the beverage's understanding given its artisanal and complex origin. In the present study, pulque was analyzed directly from five producers located in El Marqués and Cadereyta de Montes, Querétaro, sampling twice during summer and collecting three process' stages: aguamiel (raw material), fermentation starter, and pulque joven (finished beverage). Temperature, viscosity, titratable acidity, pH, °Brix, yeast, lactic acid bacteria and total coliform bacteria content, amplicon sequencing for ribosomal regions V3-V4 (bacterial) and ITS1-5F (fungal); and exclusively for the fermented samples: direct reducing sugars, ethanol, acetic acid, and volatile profile using HS SPME-GC-MS were analyzed. Regarding aguamiel, its heterogeneity could be attributed to the *Agave* species used in each region (pH and viscosity in the range of 4.38-8.15 and 1.29-2.28 cP, respectively). Although some homogeneity exists among fermented matrices, fermentation stage, *Agave* species used, and the producing station mainly influence pulque's characteristics (pH, viscosity and ethanol in the range of 3.51-4.25, 1.44-2.02 cP, and 1.07-2.21% (v/v), respectively and 3.51-4.14 and 1.40-1.89 cP for the starter) Pulque joven's volatile profile is mainly influenced by *Agave* species and producing region; further identifying thirteen compounds present (aroma core) in all pulque joven samples analyzed in the regio, being those mainly esters, superior alcohols and organic acids. On microbial diversity, common (*Lactobacilli*, *Saccharomyces*, *Zymomonas* y *Leuconostoc*, mainly) and exclusive for Querétaro (*Fructobacillus*, *Alkanindiges* y *Komagataeibacter*) microbial groups were found comparing with other studies. Though each analyzed sample could be considered as unique regarding its microbiota, regional microbial cores were identified. The previous information stands the base for future efforts on the beverage's categorization and standardization, always preserving its artisanal origin.

Keywords: agave, pulque, aguamiel, volatile compounds, microbiota.

1. Introducción.

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana obtenida mediante fermentación espontánea de aguamiel de un conjunto de especies del género *Agave* L. Actualmente, el consumo y producción de la bebida se encuentran en una situación diferente a la de bonanza de inicios del siglo XX, a pesar de su producción ancestral en la región central mexicana (Escalante et al., 2016; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021 a). Dadas las particularidades de la bebida y su producción exclusiva y ancestral en el centro de México, incluyendo Querétaro, el pulque tiene el potencial de retomar su valor histórico como una bebida tradicional popular (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012; Escalante et al., 2016; SIAP, 2021a).

Querétaro es parte de la región productora de agave o “maguey pulquero”, ubicándose actualmente en el sexto lugar a nivel nacional en superficie de maguey plantado, pero con una discreta producción de la bebida. La participación del sector académico es ahora más pertinente que nunca para impulsar la producción y consumo de esta en el estado, para el beneficio de los productores, la defensa de sus tradiciones y de la bebida (SIAP, 2021a; SIAP, 2021b).

La producción de la bebida se realiza típicamente en lote, con la microbiota nativa y a temperatura ambiente. Dado que la microbiota inicial de la fermentación es altamente dependiente del nicho geográfico de producción, surgen cuestionamientos acerca de qué microorganismos comunes y específicos región (tanto en beneficio de la bebida como en riesgos a su inocuidad) existen en el pulque de Querétaro con respecto a las regiones pulqueras ya estudiadas (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012). Estudios acerca de la microbiota del pulque producido en diferentes regiones de México, han encontrado tanto microorganismos comunes (principalmente asociados al género *Leuconostoc* y lactobacilli) como exclusivos (igualmente dentro de los géneros *Leuconostoc*,

lactobacilli, *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Zymomonas*). (Escalante et al., 2004; Escalante et al., 2008; Escalante et al., 2016).

Es importante notar que la microbiota asociada a la bebida es determinante en las características químicas y sensoriales de la misma (Astudillo-Melgar et al., 2023; Chacón-Vargas et al., 2020; Escalante et al., 2008). Las principales características sensoriales de la bebida se han asociado a la presencia de etanol, ácido acético, ácido láctico y diversos polisacáridos, por ello, se puede definir sensorialmente al pulque como una bebida alcohólica, ácida y viscosa (Escalante et al., 2016); sin embargo, existe un número limitado de estudios relacionados con la evaluación tanto de las características sensoriales como de los componentes más relevantes en el aroma del pulque producido en México, presentándose así un área de oportunidad para ampliar el conocimiento sobre el pulque (De León-Rodríguez et al., 2007; Medina-Mendoza, et al., 2022).

Adicionalmente, el pulque podría adquirir una denominación de origen, en función de que se produce de manera exclusiva en el centro de México, que emplea ciertas especies de agaves, bajo un proceso de elaboración esencialmente común en la región, con una operación de fermentación que emplea mayoritariamente materias locales y microorganismos naturalmente presentes en el ambiente y que es heredera de una tradición milenaria. Para la consecución futura de esta denominación, es necesario primero la generación de información relativa a las características de la bebida en cada región productora para, de esta forma, proponer una legislación actual que defina a la bebida con respecto a sus características microbiológicas, físicas y químicas (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2020).

El presente estudio busca caracterizar el pulque producido en Querétaro en cuanto a su microbiota, las propiedades químicas, físicas y los compuestos asociados al aroma. La información generada aportará elementos para la posible actualización

de la legislación nacional y, en conjunto con información de otros estudios, contar con evidencia suficiente para una futura denominación de origen de la bebida, en beneficio de los productores, en honor a la tradición ancestral prehispánica y para su revalorización social.

2. Antecedentes

2.1 El pulque como bebida ancestral.

El pulque es una bebida alcohólica, ácida, de color blanco y textura viscosa producida en México desde tiempos inmemoriales. La bebida es producida mayoritariamente en la región central del país, donde existen varias especies de agave adecuadas para la obtención y transformación del aguamiel en pulque (Figura 1) (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021).



Figura 1. Principales estados de México asociados a la presencia de diversas especies de agave y a la producción de pulque (Castro-Muñoz & Garcia-Arce, 2021).

La evidencia existente remonta el inicio del aprovechamiento del agave hasta los períodos donde los cazadores recolectores dominaban el continente americano (miles de años antes de la era común), mientras que la producción y consumo del pulque, se remonta a períodos en la historia tan distantes como el florecimiento de la ciudad estado de *Teotihuacán* (200-550 e.c.) o el desarrollo de la cultura otomí (2,000 a.e.c.) (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2016).

Para varias civilizaciones prehispánicas mesoamericanas (como los aztecas, toltecas u olmecas), el pulque suponía una bebida sagrada y beneficiosa y sus efectos intoxicantes eran interpretados como una vía de comunicación con los dioses. En el caso específico de los aztecas, quienes desarrollaron ampliamente las técnicas de producción tanto de aguamiel como de pulque, su uso estaba limitado para celebraciones religiosas y su abuso era condenado (incluso hasta con la muerte); permitiéndose su consumo fuera de rituales únicamente a niños, ancianos, mujeres en periodo de lactancia y embarazadas (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021, Escalante et al., 2012).

El pulque tiene igualmente un lugar especial dentro de la mitología prehispánica. En este sentido, el pulque fue el causante del exilio de *Quetzalcóatl*, luego de que este lo tomara y actuara de manera ridícula. Así mismo, se relata la historia de *Mayahuel* y *Quetzalcóatl*, quiénes escaparon del paraíso para venir a la tierra a cantar y bailar bajo la apariencia de ramas de árboles hasta que, la abuela de *Mayahuel* (una *tzitzimitl*, un ser oscuro) para castigarles, destruyó la rama de su nieta. *Quetzalcóatl* enterró con gran tristeza esta rama, de la que más tarde surgiría el primer agave (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2016).

Dentro de la concepción mística prehispánica asociada al pulque, el conejo y la zarigüeya (o *tlacuache*) fueron animales comúnmente empleados en diversos códices prehispánicos para hacer referencia al pulque. El conejo estaba asociado como el *nahual* o alter ego animal de la diosa *Mayahuel* y era considerado un elemento dual que reflejaba intoxicación, transformación, menstruación y embarazo. En el caso del *tlacuache*, diversos códices hacen referencia a este marsupial y lo relacionan con diversos significados como el fuego, la luna, el nacimiento o el pulque (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021).

Tras la caída del imperio azteca y el establecimiento del dominio español, el pulque perdió su valor religioso y se convirtió en una bebida alcohólica popular, no exenta de controversias asociadas a su consumo (asociado a clases indígenas y de clase baja) y a las distintas prohibiciones derivadas de su abuso, como la ocurrida a mitad del siglo dieciocho o las impuestas durante inicios del siglo veinte (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

Durante el período colonial (1521-1821), la producción del pulque se consolidó como una actividad económica importante, dando origen a las “haciendas pulqueras” en los estados centrales mexicanos de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Michoacán y Querétaro. Estas haciendas, pertenecientes al sector español dominante, se especializaron en la producción del agave, su transformación en pulque y la posterior distribución de este (principalmente en la región central del país), sin introducir prácticamente cambios a la forma en que se producía el pulque en la época prehispánica (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

Las haciendas pulqueras mantuvieron viva la producción del pulque, la cual recibió un impulso vital a mediados del siglo XIX con la introducción del ferrocarril, alcanzando una producción anual de hasta 500 millones de litros provenientes de 140 millones de agaves para los inicios del siglo XX. Sin embargo, ya entrado el siglo XX, comenzó un declive en la producción y consumo del pulque asociado a la introducción y creciente popularidad de la cerveza, a la implementación de las reformas distributivas de la tierra emanadas de la Revolución Mexicana (lo que puso fin a las Haciendas Pulqueras), a las constantes campañas para desincentivar su consumo (asociadas a su abuso) y a una discreta inversión científica y tecnológica en su producción (Escalante et al., 2012; Escalante, et al., 2016).

2.1.1 Panorama actual del pulque en México y el estado de Querétaro

La situación actual del pulque está limitada a la producción artesanal (principalmente, aunque con algunas excepciones) y a un consumo mayoritario en zonas rurales y entre población de mayor edad. Hidalgo, Tlaxcala y el Estado de México lideran la producción de pulque a nivel nacional (Cuadro 1) (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016; SIAP, 2023).

Cuadro 1. Superficie plantada de agave pulquero en México y la producción de pulque para el año 2023.

Estado	Superficie sembrada (Ha)	Producción (miles de litros)
Hidalgo	4,958.10	106,155.66
Tlaxcala	1,030.00	44,391.33
México	1,744.00	26,045.81
Puebla	1,031.34	11,082.93
Veracruz	120.00	1,514.20
San Luis Potosí	58.00	1,279.92
Guanajuato	16.00	180.00
Guerrero	1.50	8.25
Michoacán	5.50	0.00

Fuente: (SIAP, 2023).

Querétaro es una región productora de agave o “maguey pulquero”, concentrándose, principalmente, en los municipios de Cadereyta de Montes, Ezequiel Montes, Colón, Tolimán y Peñamiller (Figura 2). Según datos oficiales, en la entidad para los años 2021 y 2023 no se reportó producción pulquera, mientras que en 2022 fue de 613,000 litros. Existe un interés oficial renovado recientemente para fomentar la revalorización del pulque en la entidad mexicana y posicionar a la bebida como un referente del estado mexicano (Gobierno Municipal El Marqués, 2022; SIAP, 2021b; SIAP, 2022; SIAP, 2023).

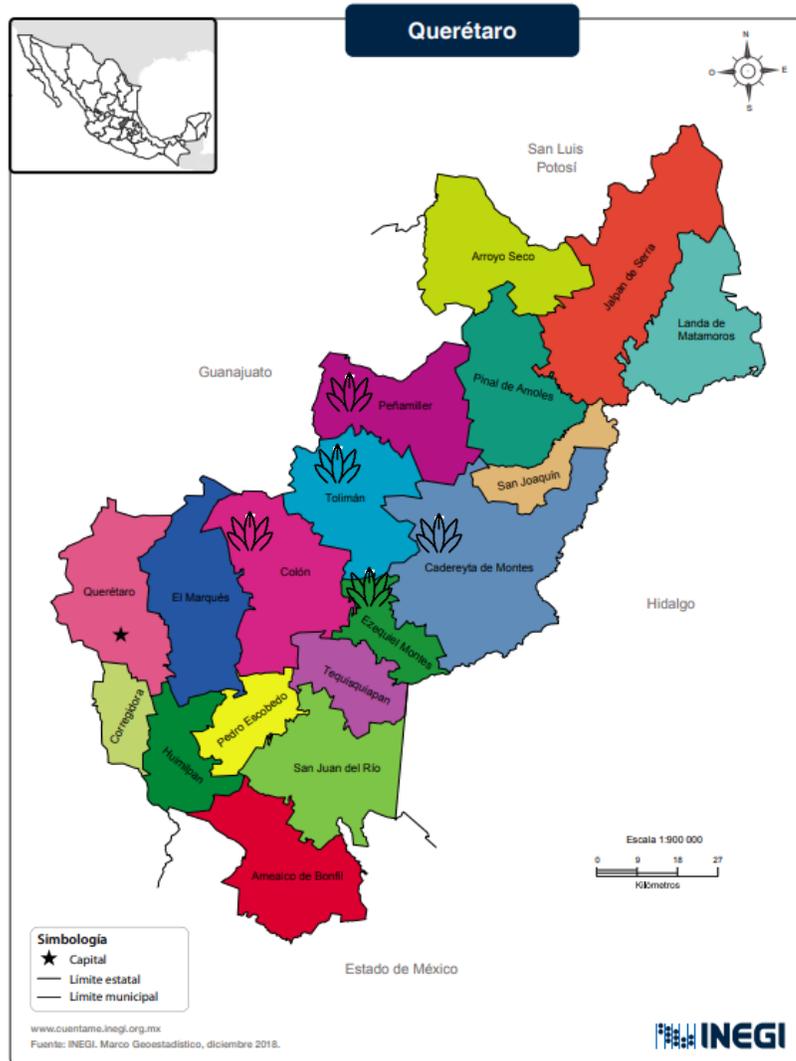


Figura 2. Principales municipios productores de agave pulquero y de pulque marcados con un ícono de agave o maguey pulquero (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2020; SIAP, 2021b; SIAP, 2022; SIAP, 2023).

En años recientes, el pulque ha vuelto a aparecer como una bebida relevante y ha despertado el interés de la comunidad científica para caracterizar a la bebida y el proceso de producción, así como de conocer el potencial de los microorganismos que contiene (Figura 3). Este esfuerzo es más relevante que nunca, pues tanto la

producción de maguey pulquero como la producción de pulque en la actualidad se encuentran en una situación completamente diferente a la que se tenía principios del siglo XX, época en la que se reportaba una producción de cerca de 500,000,000 L de pulque anuales, cifra que nunca se ha vuelto a alcanzar a lo largo del siglo XX y XXI como se aprecia en la Figura 4 (Escalante et al., 2016; Moreno-Terrazas et al., 2017).

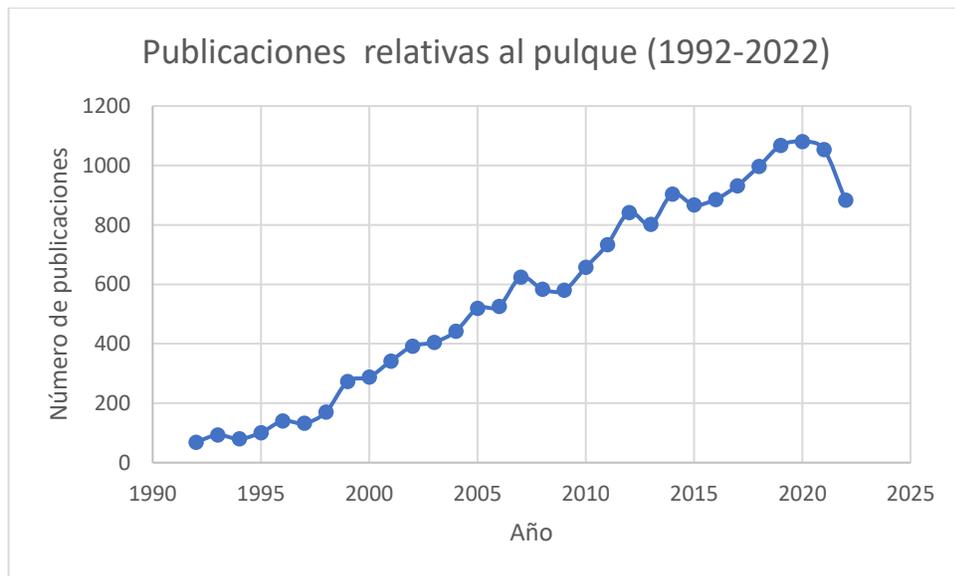


Figura 3. Publicaciones relacionadas con pulque desde el año 1992 hasta 2022 (elaboración propia con datos de PubMed, 2023).

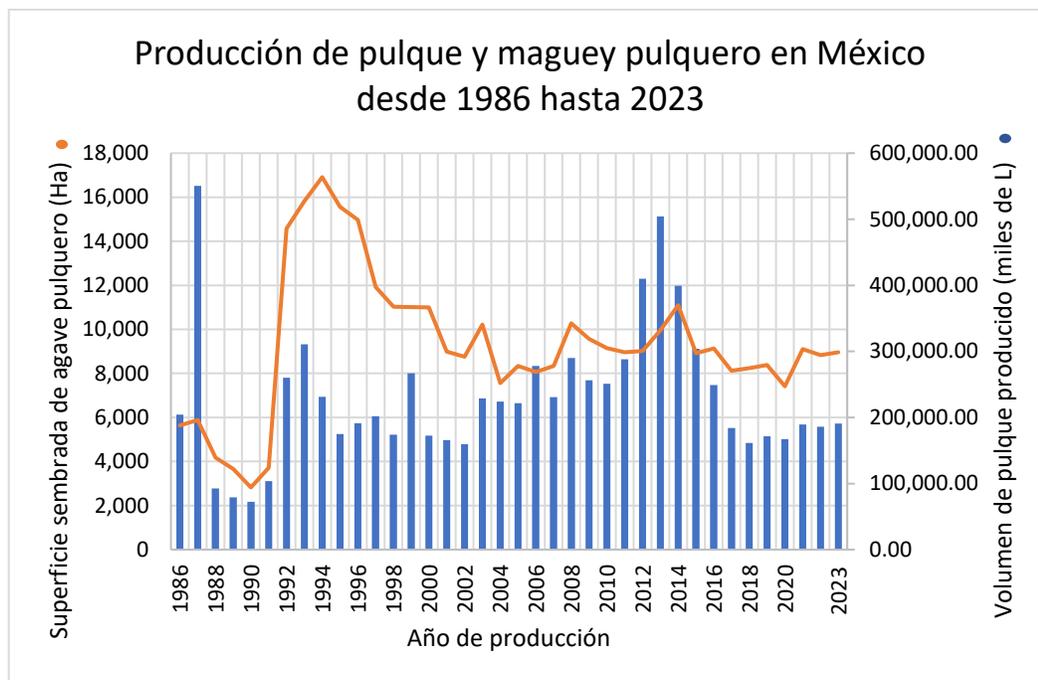


Figura 4. Producción de pulque y maguey pulquero en México desde 1986 hasta 2023. Elaboración propia con datos de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021a), SIAP (2022) y SIAP (2023).

2.2 Agave

La familia *Agavaceae* abarca cerca de 9 géneros y 300 especies, muchas presentes en México. El género *Agave* L. pertenece al orden *Asparagales* y cerca del 75% de las especies se encuentran en México y 55% son endémicas. Un número limitado de especies son empleadas para la producción de pulque, entre las que destacan *A. atrovirens*, *A. americana*, *A. salmiana* y *A. mapisaga* (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

El agave es una planta sumamente adaptable, desarrollándose en una amplia variedad de condiciones ambientales como climas áridos, semi-áridos o templados, con pocas e irregulares precipitaciones y en suelos pobres, arenosos y bien drenados, lo que explicaría su amplia distribución y abundancia en el territorio

mexicano. A través del estudio de coprolitos y diversas herramientas halladas en cuevas habitadas por los primeros pobladores del valle de México, ha sido posible considerar al agave como una fuente importante de alimento, medicinas, materiales y bebidas para el hombre desde tiempos previos a la era común (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021).

En cuanto a su propagación, se puede realizar por medio del trasplante de *mecuates* o *hijuelos* (una planta adulta puede producir hasta 50) provenientes de una planta adulta tras un periodo de 7 a 25 años de crecimiento, o bien por medio de la plantación directa de las semillas del agave. Generalmente, se plantan en hileras (*metepantles*) alejadas de árboles (Escalante, et al., 2016).

2.2.1 Condiciones climatológicas y geográficas de las regiones productoras de agave del estado de Querétaro

Querétaro presenta 9 tipos de suelo en su superficie: vertisol, umbrisol, regosol, planosol, phaeozem, lluvisol, leptosol, cambisol y calcisol. En el Cuadro 2 se presentan los tipos de suelos que se encuentran en las regiones productoras de maguey pulquero del estado.

Cuadro 2. Tipos de suelo de las diferentes regiones productoras de maguey pulquero en Querétaro.

Región productora	Tipo de suelo
Cadereyta de Montes	Vertisol, calcisol, leptosol, lluvisol y phaeozem.
Colón	Umbrisol, leptosol, phaeozem y vertisol.
El Marqués	Phaeozem, vertisol y leptosol
Ezequiel Montes	Calcisol, vertisol y phaeozem.
Peñamiller	Leptosol, lluvisol, phaeozem y regosol.
Tolimán	Lluvisol, phaeozem y leptosol.

(Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b).

A continuación, se presentan las características de cada tipo de suelo presente en las regiones productoras:

- Vertisol: Suelo pesado en condiciones de saturación-sequía, con grietas anchas cuando están secos. Suelos fértiles con alta retención de humedad y estables frente a la erosión.
- Lluvisol: suelo fértil para la agricultura, Quinto tipo de suelo más extendido en México.
- Phaeozem: asociados a climas secos y subhúmedos en regiones planas. Fértiles en magnesio, potasio y carentes de carbonatos.
- Leptosol: suelos con menos de 25 cm de espesor, conformados mayoritariamente de piedras o gravas. Muy susceptible a la erosión.
- Regosol: suelos pedregosos.
- Calcisol: suelos abundantes en carbonato de calcio. Ampliamente extendido en México, con buen potencial agrícola tras fertilización con nitrógeno, hierro, fósforo y zinc.
- Umbrisol: suelos oscuros y ácidos asociados a climas húmedos o subhúmedos de ambientes montañosos. Susceptibles a la erosión.

(Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b).

Con respecto a la precipitación promedio total anual en las regiones productoras, El Marqués, Cadereyta, Tolimán, Peñamiller y El Colón presentan un promedio de 334.4 mm, mientras que Ezequiel Montes es de 538 mm (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b). En el Cuadro 3 se presentan las distintas temperaturas anuales promedio y por temporada de las regiones productoras de agave.

Cuadro 3. Temperatura media anual y por temporada de las regiones agaveras.

Municipio	T media anual (°C)	T media primavera (°C)	T media Verano (°C)	T media otoño (°C)	T media invierno (°C)
Cadereyta	19.7	24.3	24.6	21.3	15.6
Colón	19.7	24.3	24.6	21.3	15.6
El Marqués	19.7	24.3	24.6	21.3	15.6
Ezequiel Montes	17.6	23.2	23.3	21.1	19.1
Peñamiller	19.7	24.3	24.6	21.3	15.6
Tolimán	19.7	24.3	24.6	21.3	15.6

(Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b).

2.3 Proceso de obtención del pulque

El pulque es una bebida fermentada alcohólica producida y consumida exclusivamente en México con una tradición milenaria. El proceso de preparación de la bebida sigue siendo muy similar al originalmente empleado desde tiempos inmemoriales, consistiendo en cuatro operaciones comunes en las diversas regiones productoras: castración, raspado y extracción de aguamiel, preparación de la semilla y fermentación (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

2.3.1 Castración

La obtención del aguamiel comienza con el castrado (usualmente en primavera u otoño) de agaves pulqueros maduros (de siete a diez años). Es importante mencionar que el aguamiel obtenido variará en función de la especie de agave empleada. En la operación, se destruye el pedúnculo que dará origen al quiote o brote floral la flor y las hojas centrales de la planta. La lesión ocasionada en la planta genera una cavidad circular al centro de esta (“cajete”), la cual permanece protegida del ambiente por medio de piedras u hojas del mismo agave por hasta 12 meses

para permitir la “maduración” del aguamiel en la planta (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

La castración es responsabilidad del *tlachiquero*, quien debe elegir el momento exacto para realizar la castración, evitando el brote de las flores ya que, si esto ocurre, el agave jamás producirá aguamiel, o bien, evitando la castración de un agave joven, pues producirá un bajo volumen de aguamiel (Escalante, et al., 2012).

2.3.2 Raspado y extracción del aguamiel

Una vez realizado el castrado, se raspan las paredes del *cajete* con una herramienta filosa para provocar la salida del aguamiel. Este aguamiel es recolectado típicamente con un sifón (“*acocote*”) que permite la succión oral del aguamiel y su recolección, comúnmente, al amanecer y al anochecer. Tras cada recolección, las paredes del *cajete* son raspadas nuevamente para inducir la salida continua del aguamiel (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

El aguamiel consiste en un líquido viscoso, ligeramente opaco, dulce y con sabor herbáceo, con un pH prácticamente neutro y con carbohidratos como el mayor componente nutricional (7-14% m/v, dependiendo del agave empleado y otras particularidades), además de proteínas, aminoácidos libres, minerales y vitaminas. La composición específica del aguamiel dependerá de la variedad de agave empleada, las condiciones del cultivo, la estacionalidad, la humedad relativa y las propiedades del suelo (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012). Es claro entonces apreciar al aguamiel como la materia prima que permitirá el desarrollo de diversos microorganismos los que, al fermentarle, generarán al pulque. Una vez el aguamiel es recolectado, se almacena en contenedores (generalmente de plástico) para después ser transportado e iniciar la fermentación para obtener el pulque (Escalante, et al., 2016).

Un agave pulquero es capaz de generar de 6 a 8 L diarios de aguamiel por un periodo de recolección de 3 a 6 meses, es decir, hasta 1,000 L de aguamiel pueden obtenerse del agave pulquero durante su etapa de producción. La cantidad de aguamiel variará en función de la temporada: al inicio de la castración, se esperan rendimientos de 0.4 L/día, seguido de una producción de 4-6 L/día durante 3 a 6 meses, retornando a 0.4 L/día antes de que el agave muera (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012).

La NMX-V-022-1972 permite la clasificación del aguamiel obtenido del agave o “maguey pulquero” en dos tipos: I y II. Esta clasificación se realiza considerando tanto características organolépticas (sabor dulce característico, apariencia traslúcida y color ambarino característico) como físicas y químicas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación del aguamiel con base en la NMX-V-022-1972

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	Menor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20 °C	59	100	27
Sólidos totales g/100 mL	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/mL	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 mL	2	3	3
Gomas (en glucosa) g /100 mL	2	6	0.20
Proteínas mg/100 mL	300	600	100
Cenizas mg/100 mL	300	430	180
			No mayor de
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico)	0.90	1.03	4.00

(Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 a).

2.3.3 Preparación de semilla

La fermentación del pulque (ya sea para la preparación de la semilla, puntas o pulque comercial) se puede describir como una fermentación en lote sin agitación en condiciones no asépticas (Escalante et al., 2016).

La semilla se puede definir como el cultivo iniciador de la fermentación del pulque comercial. Su preparación puede darse de dos formas y cada una se distingue en la NMX-V-037-1972. Estas abarcan la preparación por medio de la fermentación natural con la microbiota propia del aguamiel (“semilla del pulque”) o bien, empleando un inóculo de pulque de calidad en aguamiel (“pulque de punta”). Ambos tipos de pulque tienen las características comunes de emplear aguamiel tipo I y de poder servir como iniciadores de la fermentación del pulque que será comercializado (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 a; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b).

Para preparar la “semilla del pulque”, se coloca un volumen dado de aguamiel en un contenedor, permitiendo su fermentación hasta la adquisición de características sensoriales deseables. Esta fermentación puede tomar de 8 a 30 días, dependiendo principalmente de las condiciones ambientales (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b).

En el caso del “pulque de punta”, la fermentación inicia agregando aproximadamente 2 L de pulque semilla fermentado de buena calidad en un recipiente de 20 L (ya sea de vidrio, plástico, barro o madera), adicionando posteriormente aguamiel hasta el volumen deseado (las proporciones pueden variar en función del productor específico). El aguamiel se deja fermentar a temperatura ambiente de una a cuatro semanas, hasta que alcance un sabor alcohólico-acético

característico o hasta que se forme una capa superficial llamada “zurrón” (Escalante, et al., 2016; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b).

2.3.4 Fermentación

La fermentación del aguamiel para producir el pulque comercial ocurrirá con microorganismos provenientes de varias fuentes distintas: desde aquellos asociados al agave, aquellos inoculados (provenientes de un pulque de buena calidad, la llamada “semilla” o “pulque de punta”) hasta aquellos incorporados durante la colecta, manipulación y transporte del aguamiel (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021).

Aguado-Santacruz et al. (2022) ejemplifica el origen endófito que algunos microorganismos involucrados en la fermentación del aguamiel podrían tener. El estudio se acotó a identificar la endomicrobiota asociada a *A. salmiana* en una localidad del estado de Tlaxcala (específicamente asociada a las pencas de plantas en desarrollo intermedio y sanas), mediante el aislamiento de microorganismos y la subsecuente construcción de una biblioteca de clonas para secuenciar el gen ribosomal 16S. Este estudio permitió identificar principalmente a bacterias del género *Bacillus*, seguido de los géneros *Enterobacter* y *Leclercia*, todos con una descripción previa como posibles promotores de crecimiento en plantas.

Recientemente, dentro de las conclusiones encontradas por Astudillo-Melgar et al. (2023) (que se discutirán más adelante), es relevante en esta sección mencionar la detección mediante el empleo de secuenciación de amplicones de un grupo o “núcleo” (*core* en inglés) de microorganismos presentes en el residuo vegetal producido tras el raspado del cajete del agave o “metzal”: *Zymomonas*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Obesumbacterium*, *Lactobacillus* y *Gluconobacter*; todos estos microorganismos fueron detectados a su vez en aguamiel y en etapas más avanzadas de fermentación, demostrando así la relevancia de los microorganismos endófitos del agave en la producción de pulque.

El pulque (ya sea semilla o de punta) será ahora inoculado en un nuevo lote de aguamiel (filtrado previamente) para su fermentación “controlada” en envases de piel, plástico o madera, ya sea en lugares cerrados o abiertos. La fermentación dependerá, como se mencionó previamente de los microorganismos endófitos, pero también de la microbiota de la semilla empleada, la temporada (con relación a la temperatura ambiental) y calidad del aguamiel, principalmente. Por ejemplo, en épocas cálidas, una regla empírica consiste en mezclar más aguamiel que iniciador, mientras que, en épocas frías, se recomienda mezclar más iniciador que aguamiel. La proporción iniciador:aguamiel puede variar de productor a productor, aunque estándares de producción comunes son las mezclas 80:20 o 20:80, aunque el proceso artesanal de elaboración difícilmente respeta alguna proporción, dada la recolección y colección de aguamiel (por lo menos dos veces al día) en los envases donde ocurre la fermentación (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012; Escalante, et al., 2016; Gómez-Aldapa, et al., 2012).

Generalmente, el tiempo de fermentación para el pulque comercial es de 3 a 6 horas, aunque puede extenderse hasta 12 días. Al finalizar la fermentación, se habrán desarrollado ya los microorganismos responsables de las diferentes fermentaciones que ocurren, la alcohólica (levaduras y *Zymomonas mobilis*), la ácida (bacterias ácido-lácticas y acéticas) y otros involucrados en la adquisición de la viscosidad de la bebida (bacterias ácido-lácticas, principalmente del género *Leuconostoc* y *Z. mobilis*); generando las principales características del pulque (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante, et al., 2016).

Actualmente, se cuenta con una norma de calidad del pulque (NMX-V-037-1972) que, aunque con algunas limitaciones, sirve como guía para la obtención y caracterización sensorial (color blanco y sabor característico) y física y química del producto (Cuadro 5) (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b).

Empíricamente, se pueden distinguir dos tipos de calidad de pulque: excelente y pobre. Un pulque excelente está asociado a la fermentación de aguamiel de calidad (tipo I, con base en la NMX-V-022) obtenida de *A. salmiana* var. *Salmiana*, *A. mapisaga* y *A. atrovirens* cultivadas en climas fríos y terrenos secos; un pulque pobre, por otro lado, se obtiene tras la fermentación de un aguamiel producido en regiones cálidas y húmedas (Escalante et al., 2012).

La fermentación del pulque se realiza en condiciones no estériles, por lo que otros microorganismos ajenos a la fermentación y a la planta, podrían eventualmente participar en la fermentación. La diversidad y cantidad de microorganismos que participan en la fermentación es sumamente compleja, aunque se ha reportado de manera consistente bacterias ácido-lácticas y levaduras (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012). Una vez terminada la fermentación, el pulque puede consumirse directamente o se puede adicionar con frutas, nueces o especias (“curado”) (Escalante et al., 2016).

Cuadro 5. Clasificación del pulque con base en la NMX-V-037-1972.

Especificaciones	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Grado refractométrico (refractómetro de inmersión a 20 °C)	32	35	25	---
Índice de refracción a 20 °C	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380
pH	Menor a 3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (ácido láctico) g/100 mL	0.40	0.75	0.40	0.70
Reductores totales (glucosa) g/100 mL	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico % (v/v)	6	9	4.0	6.0

(Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b).

La bebida es típicamente producida en pequeña escala y de manera artesanal, lo que limita su consumo al entorno local de producción, con una vida de anaquel de uno a tres días (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012).

Por otra parte, la industrialización del pulque, además de requerir un cambio radical en la percepción pública de la bebida, presenta múltiples retos asociados, principalmente:

- Optimización en la colecta del aguamiel. La composición y cantidad de este puede variar en función de la edad del agave, la época de recolección, la región donde se encuentre la planta y la variedad de agave empleada.
- Propagación de variedades seleccionadas de agaves pulqueros.
- Inocuidad del aguamiel. Una colecta higiénica, acompañada de una pasteurización prefermentación o de una refrigeración postcolecta, serían operaciones adecuadas para lograr este objetivo.
- Control de la fermentación. Una idea clara sobre la composición óptima de microorganismos iniciadores por inocular en el aguamiel permitiría tener un mayor control sobre las características sensoriales del pulque, además de que se facilitaría su procesamiento (por ejemplo, reduciendo la producción de exopolisacáridos asociados a *Z. mobilis* o *Leuconostoc* spp.). La producción exitosa de pulque enlatado en el estado de Tlaxcala, como ejemplo, conllevó justamente un control de la fermentación para reducir desviaciones sensoriales y la viscosidad del producto.
- Estabilización de la bebida. A pesar de que el pulque contiene comúnmente microorganismos al consumirse, su escalamiento industrial implicaría pasteurizar, filtrar o añadir diferentes aditivos alimentarios al pulque previo su envasado para alargar su vida de anaquel, perdiendo así su contenido probiótico y pudiendo modificar además sus características sensoriales típicas. Algunas de estas operaciones son llevadas a cabo en diversas casas pulqueras, en las que la bebida se comercializa enlatada.

(Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012; Escalante et al., 2016).

En un esfuerzo por incorporar nuevos acercamientos a la producción, Alcántara-Závala et al. (2019) lograron extender la vida de anaquel del pulque hasta 22 días con la aplicación de calentamiento óhmico, conservando en buena medida sus características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas en comparación con una pasteurización convencional. En el mismo sentido, el pulque ha sido caracterizado en sus características dieléctricas, haciendo posible la evaluación de

microondas como una tecnología alternativa para reducir el tiempo convencional de pasteurización de la bebida (Kataria et al., 2019).

2.4 Propiedades nutritivas y posible funcionalidad del aguamiel y del pulque

El aguamiel está compuesto principalmente por carbohidratos, en la forma de sacarosa, glucosa, fructosa y diversos oligosacáridos (dextranos y fructanos, principalmente). De igual forma, el aguamiel contiene diversos aminoácidos, proteínas y minerales. Las concentraciones de cada uno de estos nutrimentos dependen de varios factores como se ha mencionado, pero se muestran algunos datos de la literatura en el Cuadro 6 (Alcántara-Zavala, et al., 2019; Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012).

Cuadro 6. Principales nutrientes en el aguamiel y sus concentraciones.

Compuesto	Concentración
Sacarosa	1.0 g/100 mL
Fructosa	3.7-4.7 g/100 mL
Glucosa	2.3-3.0 g/100 mL
Fructooligosacáridos	1.17 g/100 mL
Sodio	25 mg/100 mL
Magnesio	9 mg/100 mL
Calcio	8.1-20.0 mg/100 mL
Fósforo	9.0-20.0 mg/100 mL
Hierro	0.1-1.1 mg/100 mL
Zinc	0.8 mg/100 mL
Cobre	0.3 mg/100 mL
Tiamina	0.02-0.1 mg/100 mL
Riboflavina	0.01-0.03 mg/100 mL
Niacina	0.4-0.5 mg/100 mL
Biotina	19,6 mg/100 mL

Compuesto	Concentración
Ácido pantoténico	65.17 mg/100 mL
Piridoxina	22.98 mg/100 mL
Ácido ascórbico	9 mg/100 mL
Lisina	3.1 mg/100 mL
Triptófano	0.46 mg/100 mL
Histidina	0.69 mg/100 mL
Fenilalanina	2.64 mg/100 mL
Leucina	1.26 mg/100 mL
Treonina	1.84 mg/100 mL
Valina	1.26 mg/100 mL
Arginina	3.45 mg/100 mL
Tirosina	1.15 mg/100 mL

(Escalante et al., 2012; Moreno-Terrazas, et al., 2017).

El consumo de bebidas alcohólicas es parte esencial dentro de la cultura mexicana. En el caso del pulque, más allá de su contenido alcohólico, existen otras particularidades que lo convierten también en una bebida nutritiva (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2016).

El pulque puede proveer cantidades significativas de agua y varios micronutrientes como ácido ascórbico, hierro no hemo, niacina, tiamina y riboflavina, además de algunos aminoácidos (aunque en menor cantidad que en diversos productos cárnicos) como isoleucina, leucina, lisina, triptófano, histidina, treonina, fenilalanina, valina, entre otros. Asimismo, el pulque contiene compuestos bioactivos como saponinas, asociadas con propiedades antiinflamatorias, antibióticas e hipocolesterolemiantes (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2016).

En este sentido, se estudió el efecto del consumo de pulque sobre la salud de los pobladores del Valle del Mezquital (centro de México) que emplean el pulque como

parte cotidiana de su dieta, siendo uno de los tres principales alimentos consumidos diariamente. Adicionalmente, el pulque supone una fuente importante de energía, proteína, diferentes vitaminas (como vitamina C y tiamina) y de algunos minerales como calcio y hierro. (Escalante et al., 2012).

Con respecto a poblaciones específicas como mujeres embarazadas y lactantes, los resultados limitan el consumo de pulque (hasta de 20 g de etanol, aproximadamente) durante este periodo para suplir deficiencias nutrimentales en la población rural estudiada (especialmente, hierro, ácido ascórbico y vitaminas del complejo B), al mismo tiempo que se reducen los efectos negativos asociados al consumo de etanol. Es importante notar que los autores de estos estudios concluyen que, si bien el pulque puede resultar benéfico durante el embarazo y lactancia sólo si se consume en cantidades bajas, no es recomendable su consumo como una práctica habitual durante estas etapas y se entiende su consumo en estos periodos únicamente en el contexto de deficiencias nutrimentales ampliamente distribuidas en algunas poblaciones rurales del centro de México (Backstrand, et al., 2001). La recomendación relativa al consumo de alcohol durante el embarazo de diversas instituciones públicas continúa siendo la de completa abstinencia para evitar la aparición de desórdenes fetales relativos al consumo de etanol (Backstrand et al., 2001; Centers for Disease Control and Prevention, 2022; National Health Service, 2020).

De igual forma, el pulque es fuente de fitasa (producida ya sea por *Lactobacillus* spp. o *Saccharomyces cerevisiae*), la cual ha sido empleada para aumentar la biodisponibilidad de hierro y zinc en productos derivados del maíz (Escalante et al, 2016).

La presencia de prebióticos (sustancias no digeribles por el organismo humano que pueden ser aprovechadas por determinados microorganismos del microbioma intestinal) en el aguamiel y el pulque han significado un impulso importante en la

investigación de la bebida, principalmente provenientes del aguamiel (Castro-Muñoz & García-Arce, 2023). Dentro de esos prebióticos, destacan las agavinas, nombre genérico empleado para hacer referencia a fructanos y dextranos con diversa ramificación (Escalante et al., 2016).

2.5 Microorganismos asociados al pulque

En el proceso de elaboración del pulque, existen una gran cantidad de fuentes de microorganismos, los cuales pueden participar en la fermentación: desde el *cajete* hasta la manipulación del aguamiel. Con base en estudios realizados en la década pasada, fue posible identificar cuatro grupos microbianos que definen en gran medida las características alcohólicas, ácidas y viscosas del pulque:

- A) Bacterias productoras de ácido: principalmente, bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas.
- B) Microorganismos productores de etanol: *S. cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*.
- C) Bacterias productoras de dextranos: *Leuconostoc mesenteroides* y *Zymomonas mobilis*.
- D) Microorganismos putrefactores: referente a microbiota asociada al ambiente, sin una función específica o claramente identificada dentro del producto (Escalante et al., 2016).

Es importante notar que microorganismos pertenecientes a estos cuatro grupos microbianos han sido aislados por medio de diversas técnicas en distintos trabajos acerca de la bebida en varias regiones del país (Cuadro 7).; sin embargo, estudios recientes han actualizado esta lista de microorganismos, así como su función en la bebida, los cuáles se discutirán más adelante en esta sección.

Cuadro 7. Diversidad microbiana estudiada en distintas regiones productoras de pulque.

Microorganismos identificados ^d	Región y estudio respectivo									
	Aculco, México ^a		Huitzilac, Morelos ^a		Tizayuca, Hidalgo ^a		Huitzilac, Morelos ^b		Cardonal e Ixmiquilpan, Hidalgo ^c	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>Hafnia alvei</i>										
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Ac)										
<i>Lentilactobacillus kefir</i> (Ac)										
<i>Lactobacillus acetotolerans</i> (Ac)										
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>Acetobacter pomorium</i> (Ac)										
<i>Gluconobacter oxydans</i>										
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i> (Ac)										

Microorganismos identificados ^d	Región y estudio respectivo									
	Aculco, México ^a		Huitzilac, Morelos ^a		Tizayuca, Hidalgo ^a		Huitzilac, Morelos ^b		Cardonal e Ixmiquilpan, Hidalgo ^c	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>										
<i>Z. mobilis</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (Ac, Et)										
<i>Microbacterium arborescens</i>										
<i>Acetobacter</i> spp. (Ac)										
<i>Bacillus licheniformis</i>										
<i>Fructilactobacillus sanfranciscencis</i> (Ac, Et)										
<i>Lactobacillus</i> spp. (Ac, Et)										
<i>Lactococcus lactis</i> (Ac)										
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>Blastomonas</i> spp.										

Microorganismos identificados ^d	Región y estudio respectivo									
	Aculco, México ^a		Huitzilac, Morelos ^a		Tizayuca, Hidalgo ^a		Huitzilac, Morelos ^b		Cardonal e Ixmiquilpan, Hidalgo ^c	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i> (Ac)										
<i>Lactibacillus delbrueckii</i> (Ac)										
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> (Ac)										
<i>Lactilactobacillus sakei</i> (Ac)										
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> (Ac)										
<i>Levilactobacillus brevis</i> (Ac)										
<i>L. Gelidum</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>L. Carnosum</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>L. Citreum</i> (Visc, Ac, Et)										
<i>L. Kimchii</i> (Ac, Et, Visc)										

Microorganismos identificados ^d	Región y estudio respectivo									
	<i>Aculco, México</i> ^a		Huitzilac, Morelos ^a		Tizayuca, Hidalgo ^a		Huitzilac, Morelos ^b		Cardonal e Ixmiquilpan, Hidalgo ^c	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>L. Mesenteroides</i> (Ac, Et, Visc)										
<i>Sphingobium</i> spp.										
<i>Leuconostoc</i> spp (Ac, Et, Visc)										
<i>Acetobacter radioresistens</i> (Ac)										
<i>Citrobacter</i> spp.										
<i>Enterobacter</i> spp.										
<i>Erwinia rhapontici</i>										
<i>Lactococcus</i> spp. (Ac)										
<i>Serratia grimnesii</i>										
<i>Streptococcus devriesei</i>										

Microorganismos identificados ^d	Región y estudio respectivo									
	Aculco, México ^a		Huitzilac, Morelos ^a		Tizayuca, Hidalgo ^a		Huitzilac, Morelos ^b		Cardonal e Ixmiquilpan, Hidalgo ^c	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>Kluyvera ascorbata</i> .										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ac, Et)										
<i>Kluyveromyces</i> spp. (Ac, Et)										

A: aguamiel; P: pulque. **Presencia en azul**; **Ausencia**; En blanco: no se analizó. a: Escalante et al., 2004; b: Escalante et al., 2008; c: Medina-Mendoza et al., 2022. d: interpretación de la función asociada a cada microorganismo realizada con base en Chacón-Vargas et al. 2020, Escalante et al., 2016 y Holzapfel & Wood, 2014. Estos estudios se analizan con más detalle en secciones posteriores.

Ac: productor de ácidos orgánicos; Et: productor de etanol; Visc: participante en la adquisición de viscosidad en la bebida.

Escalante et al. (2004) buscaron específicamente evaluar y comparar la diversidad microbiana asociada al pulque de diferentes localidades en estados de México con una elevada producción de pulque: Aculco, México; Huitzilac, Morelos y Tizayuca, Hidalgo. La identificación se realizó por medio de la amplificación del gen ribosomal 16S y su incorporación en *E. coli* electro competentes, seguido de una clasificación por análisis de restricción e identificación por medio de la secuenciación de estos amplicones. Los autores lograron identificar especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Zymomonas*, *Microbacterium*, entre otras. Dentro de estos géneros, incluso se detectaron especies no previamente reportadas, suponiendo un hallazgo importante (Escalante et al., 2004).

Al analizar pulques de diferentes regiones (aunque algunos con diferentes tiempos de fermentación), se aprecia una amplia variabilidad y algunos géneros que generalmente se encuentran en el proceso y que son relevantes en la obtención de la bebida, como los pertenecientes al grupo lactobacilli (homo fermentadores y hetero fermentadores), géneros *Leuconostoc* (hetero fermentador y uno de los principales productores de exo polisacacáridos) y *Zymomonas* (productor de etanol y de exo polisacáridos) (Escalante et al., 2004).

Dado que la producción de pulque se da en condiciones no asépticas y que la microbiota inicial de la fermentación es altamente dependiente del nicho geográfico de producción, surgen diversos cuestionamientos:

- ¿Los grupos microbianos comunes en otras regiones productoras del pulque se encuentran también presentes en la región de Querétaro? Esta pregunta se plantea en el sentido de definir grupos microbianos iniciadores de la fermentación del aguamiel (ya sean comunes en la región central de México o con especificaciones geográficas), pensando en la propuesta de una normativa actualizada para el pulque y la posible definición de variedades típicas regionales de la bebida. De esta forma, ¿podría demostrarse entonces la asociación en la zona productora, no sólo de una tradición pulquera común

sino también de una microbiota general característica en la región, o con variaciones geográficas bien definidas?

- ¿Qué particularidades microbianas existen en la región queretana en contraste con otras regiones productoras? En el sentido de microorganismos no previamente identificados en la matriz y su posible impacto en las características físicas y químicas de la bebida de la región, principalmente.

2.5.1 Dinámica poblacional microbiana durante la fermentación del pulque

El estudio llevado a cabo por Escalante et al. (2008) acerca de la dinámica poblacional microbiana durante la fermentación del pulque, producido en la localidad mexicana de Huitzilac, Morelos, empleando técnicas dependientes e independientes de cultivo (como el Análisis de Restricción de ADN ribosomal amplificado o ARDRA, por sus siglas en inglés), además de demostrar la pertinencia de emplear ambos acercamientos para obtener una panorámica completa de la diversidad microbiana en distintos nichos o matrices, ha permitido llegar a diversas conclusiones parciales acerca de la sucesión microbiana pre-, durante y post-fermentación (Escalante et al., 2008 Escalante et al., 2016).

Con respecto al aguamiel, se detectó una amplia cantidad y diversidad de microorganismos, principalmente, bacterias ácido-lácticas (*L. mesenteroides*, *L. kimchi*, *L. citreum* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) y microorganismos asociados a diversos nichos ambientales como *Erwinia rhapontici*, *Acinetobacter radioresistens* y *Enterobacter* spp., cuya presencia se asocia a la acumulación no controlada del aguamiel en el cajete y a su recolección no aséptica. Con respecto a la concentración de microorganismos mesófilos aerobios y bacterias ácido-lácticas, se encontraron en el orden de 10^7 a 10^8 UFC/mL, respectivamente, en cambio, las levaduras se encontraron en concentraciones de 10^4 UFC/mL (Escalante et al., 2008).

Tras la inoculación del aguamiel con “pulque semilla” o “pulque de punta”, incrementó considerablemente la presencia de levaduras en el aguamiel previo a la fermentación (hasta 10^6 UFC/mL), mientras que el grupo microbiano más abundante fueron las bacterias ácido lácticas (principalmente, *Lactobacillus acidophilus*, *Lc. mesenteroides* y *Lc. citreum*), seguido de bacterias que se podrían considerar medio ambientales como *Z. mobilis*, *Enterobacter agglomerans* y *Acetobacter malorum*, manteniéndose presentes de manera casi constante ya a lo largo de la fermentación. Con respecto a la concentración de microorganismos mesófilos aerobios y bacterias ácido-lácticas, se mantuvo prácticamente sin cambios tras la inoculación. Asimismo, se disminuyó tanto el contenido de carbohidratos y el pH en la mezcla (a 4.5 con respecto a 6.0 del aguamiel) (Escalante et al., 2008).

Durante la fermentación, la concentración de levaduras se incrementó (hasta 10^7 UFC/mL) y se mantuvo constante hasta el final de la fermentación. Con respecto a las concentraciones de las bacterias ácido-lácticas y las mesófilas aerobias, si bien las especies cambiaron a lo largo de la fermentación, estos grupos microbianos se mantuvieron ya prácticamente sin cambios cuantitativos con respecto al inicio de la fermentación (Escalante et al., 2008).

Al final de la fermentación, el grupo microbiano dominante fue, de nueva cuenta, el de bacterias ácido lácticas, principalmente, *L. acidophilus*, *Lc. mesenteroides*, *L. delbrueckii* subsp.*lactis*, la proteobacteria *A. malorum*, entre otras. Con respecto a las características físicas y químicas, el pH decreció hasta 4.3 con un descenso considerable de la concentración de carbohidratos en el aguamiel, además de un cambio en la viscosidad del aguamiel de un comportamiento dilatante a uno pseudoplástico; de igual forma, los principales productos de la fermentación fueron etanol, ácido acético y ácido láctico (Escalante et al., 2008).

El grupo microbiano más ampliamente detectado a lo largo de la fermentación en el estudio de Escalante et al. (2008), correspondió a las bacterias ácido-lácticas. Los

autores asocian esta prevalencia a la capacidad de este grupo microbiano para tolerar condiciones ácidas y concentraciones elevadas de etanol a lo largo de la fermentación.

De igual forma, Escalante et al. (2008) reportó la detección por primera vez en aguamiel y/o pulque de diversos microorganismos como *L. kimchi*, *L. acidophilus*, *L. citreum*, *Enterobacter agglomerans* y *Lactococcus lactis*.

Un acercamiento distinto (por medio de la secuenciación masiva del gen ribosomal 16S y de ITS, amplificado previamente) fue empleado por Rocha-Arriaga et al., 2020 para evaluar la diversidad microbiana del aguamiel y del proceso de fermentación en un municipio del estado de Hidalgo (Tepeapulco). Este estudio permitió identificar a los phyla *Proteobacteria* (principalmente asociado a α -proteobacteria y γ -proteobacteria) y *Firmicutes* (principalmente asociados al grupo lactobacilli) como los más abundantes a lo largo de la fermentación. Asimismo, se identificaron bacterias asociadas al género *Sphingomonas*, *Acetobacter* y *Lactobacillus* como los microorganismos más abundantes en aguamiel, a lo largo de la fermentación y en pulque terminado.

El estudio anterior permitió también estudiar la diversidad bacteriana del proceso, reportando microorganismos (tanto comunes como exclusivos) asociados a los siguientes géneros:

- Aguamiel:
 - Microorganismos asociados a 30 géneros: *Sphingomonas*, grupo lactobacilli, *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, entre otros.

- Muestra intermedia de la fermentación o “contra punta”:
 - Microorganismos asociados a 23 géneros: *Acetobacter*, *Sphingomonas*, grupo lactobacilli, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, entre otros.
- Pulque:
 - Microorganismos asociados a 15 géneros: *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Gluconobacter*, entre otros.

De igual forma, Rocha-Arriaga et al. (2020) identificaron la diversidad asociada a hongos y levaduras en cada una de las muestras. Se detectó la mayor riqueza en aguamiel, seguida de pulque y “contra punta”, siendo la especie más abundante durante la fermentación *Candida zemplinina*, seguida de *Clavispora lusitanae* y *Candida stellata*. *S. cerevisiae* fue identificada como el noveno lugar en abundancia dentro del proceso. Igualmente, se identificaron diversos microorganismos en las tres etapas del proceso, tanto comunes como exclusivos:

- Aguamiel:
 - *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*, *Dekkera anómala*, *Kazachstania gamospora*, *Penicillium* spp., *Pichia* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Clavispora* spp.
- Muestra intermedia de la fermentación o “contra punta”:
 - *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*, *Dekkera anómala*, *Kazachstania gamospora*, principalmente.
- Pulque:
 - *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae*, *Dekkera anómala*, *Kazachstania gamospora*, principalmente.

Una conclusión de este estudio, que refuerza lo reportado por otros autores, es la fluctuación de la diversidad microbiana a lo largo de la fermentación, aumentando

considerablemente en la etapa intermedia de la fermentación (“contra punta”), asociándose esta variabilidad en mayor parte a cambios bacterianos que fúngicos. Asimismo, refuerza la observación hecha por varios estudios acerca de la relación entre los microorganismos detectados con una zona de producción específica (Escalante et al., 2004; Escalante et al., 2008; Rocha-Arriaga et al., 2020).

De manera similar, Chacón-Vargas et al. (2020) estudió la diversidad bacteriana y fúngica por medio de secuenciación metagenómica shotgun en diferentes etapas de fermentación del pulque producido en Huitzilac, Morelos: aguamiel, aguamiel con inóculo, 3, 6 y 12 horas de fermentación. De esta forma los autores pudieron identificar distintos microorganismos implicados en cada etapa de la fermentación, como se muestra en Cuadro 8. **Cuadro 8.** Microorganismos detectados en distintas etapas de la fermentación de aguamiel para producir pulque.

Géneros dominantes	Matriz o etapa de la fermentación				
	Agua-miel	0 h de fermentación	3 h de fermentación	6 h de fermentación	12 h de fermentación
<i>Acinetobacter</i>					
<i>Leuconostoc</i>					
<i>Lactococcus</i>					
<i>Zymomonas</i>					
<i>Lactobacillus</i>					
<i>Saccharomyces</i>					
Presencia: en azul; Ausencia o no detectado: en rojo.					

Asimismo, los autores evaluaron la correlación entre la aparición de un cierto grupo microbiano con los principales componentes del pulque, encontrándose que hay una asociación de los cambios de ciertos grupos microbianos dominantes con variaciones en la concentración de los componentes del pulque, principalmente, con respecto a etanol, sacarosa, ácido láctico y fructosa.

Una observación importante del estudio de Chacón-Vargas et al. (2020) y que refuerza la información ya conocida es la persistencia durante la fermentación de bacterias ácido-lácticas y de la incorporación de levaduras una vez que el aguamiel es inoculado con pulque semilla.

Recientemente, Astudillo-Melgar et al. (2023) analizaron la diversidad bacteriana y fúngica asociada al material vegetal del *cajete* de una especie de agave (*A. salmiana* producido en Huitzilac, Morelos), su transferencia al aguamiel obtenido de esta planta y su permanencia y evolución a lo largo de 6 horas de fermentación controlada en laboratorio, empleando ADN metagenómico de las muestras seguido de la secuenciación de amplicones de las regiones bacterianas V3-V4 y la región fúngica ITS1. Asimismo, cuantificaron por medio de cromatografía de líquidos (HPLC) la aparición de etanol, lactato, acetato y succinato, así como el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa y, por medio de cromatografía de alto rendimiento de intercambio aniónico acoplada a detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) se realizó un seguimiento de los fructooligosacáridos presentes en las muestras a lo largo de la fermentación. Este trabajo permitió identificar el “núcleo bacteriano” de la fermentación, es decir, géneros de bacterias presentes a lo largo de toda la fermentación: *Zymomonas*, *Lactococcus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Obesumbacterium*, en orden descendente. De igual manera, lograron definir el “núcleo fúngico” de la bebida, asociado a los géneros *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y al orden Saccharomycetales. Estos grupos microbianos fueron identificados desde la planta y a lo largo de toda la fermentación. Asimismo, los autores concluyeron que la

diversidad microbiana varió en abundancia en respuesta a variaciones en la composición del sustrato.

La definición de un “núcleo microbiano” asociado a la bebida (microorganismos constantemente identificados a lo largo de la fermentación) por parte de Astudillo-Melgar et al. (2023) supone un importante acercamiento hacia el diseño de un iniciador estándar que permita la fermentación controlada de la bebida, contribuyendo a estandarizar su calidad. En este sentido, los autores sugieren ampliar el estudio hacia más especies del género *Agave*, diferentes localidades productoras y en más temporadas de producción para poder definir con mayor claridad un iniciador adecuado para la fermentación.

Las características sensoriales del pulque, como se ha mencionado, se verán influenciadas por la microbiota presente al inicio de la fermentación (Cuadro 9) y esta estará influenciada por la región geográfica de producción de la bebida, debido a su producción mayoritariamente artesanal altamente variable (Escalante et al., 2016).

Cuadro 9. Principales productos de la fermentación del aguamiel y grupos microbianos asociados.

Grupo microbiano	Productos asociados
Bacterias ácido-lácticas (homo y hetero fermentativas como <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Leuconostoc</i> sp.).	Ácido láctico, ácido acético, etanol y CO ₂
<i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> .	Etanol y CO ₂
<i>Z. mobilis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>L. kimchi</i> .	Exopolisacáridos (dextranos y fructanos).
Bacterias ácido-acéticas (<i>Acetobacter</i> spp. y <i>Gluconobacter</i> spp.)	Ácido acético y CO ₂

(Escalante et al., 2016).

La producción microbiana de aminoácidos, vitaminas y compuestos volátiles está asociada, principalmente, a las levaduras en la bebida, tanto *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. paradoxus*) como no *Saccharomyces* (*Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Hanseniaspora uvarum*, entre otras) (Escalante et al., 2012).

Por lo anterior, es evidente que la diversidad microbiana asociada a la bebida es variable y dependiente de la región en la que se produzca, lo que exalta la pertinencia de un acercamiento a regiones poco estudiadas para esclarecer particularidades o puntos en común con otras regiones ya estudiadas, pensando incluso en la generación de información que, en un futuro, permita el establecimiento de “variedades geográficas” para el pulque.

2.5.2 Microorganismos probióticos

La presencia de microorganismos probióticos ha sido uno de los principales motores de la investigación realizada sobre la bebida, entendiendo como probiótico a cualquier microorganismo vivo que, consumido en dosis adecuadas, resulta benéfico para el organismo hospedero. Los beneficios asociados a estos microorganismos contemplan la creación de un balance benéfico del microbioma entérico y la promoción de la respuesta inmune gastrointestinal (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021), aunque el impacto de estos microorganismos se considera mucho más profundo. Asimismo, el relativamente reciente surgido término de postbiótico supone una posible nueva rama de estudio con relación al pulque. Un postbiótico puede definirse como una preparación de microorganismos inanimados y/o sus componentes y que confieren un beneficio a la salud del hospedero” (Vinderola, et al., 2022).

La amplia diversidad y elevada cantidad de microorganismos en el tracto gastrointestinal humano supone múltiples beneficios, siempre y cuando esta diversidad no implique la presencia preponderante de patógenos. Recientemente,

una microbiota gastrointestinal diversa se asoció a mejores capacidades de aprendizaje, memoria y flexibilidad en el comportamiento. Además, una microbiota “sana” supone otros beneficios para el hospedero, principalmente, en la regulación de la digestión, mediando la absorción, extracción y síntesis de metabolitos variados y en la promoción de una primera respuesta inmune, compitiendo con patógenos, produciendo compuestos antimicrobianos y promoviendo la integridad del epitelio intestinal. En este sentido, este grupo diverso y abundante de microorganismos producirá metabolitos igualmente diversos y variados, algunos con capacidad de interactuar con el sistema nervioso central, modulando así la actividad cerebral, el comportamiento y la cognición (Gubert et al., 2020).

Provenientes del pulque, se han aislado diversos microorganismos sobre los que se ha evaluado su capacidad probiótica, principalmente bacterias ácido-lácticas como *Lc. mesenteroides*, *L. acidophilus* y *L. plantarum*. Es importante mencionar también a *Z. mobilis*, cuyo beneficio se asocia más como un antagonista de patógenos en la bebida. Estos microorganismos, junto con muchos otros aislados del pulque, podrían suponer la respuesta a las propiedades benéficas del pulque para prevenir y tratar problemas gastrointestinales. Además, algunos microorganismos aislados del pulque han mostrado ser tolerantes a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y de ser capaces de inhibir bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Se ha reportado que estas bacterias probióticas se adhieren a la mucosa intestinal, presentan actividad antiinflamatoria y estimulan el sistema inmune (Castro-Muñoz & García-Arce, 2021; Escalante et al., 2012, Escalante et al., 2016; Rocha-Arriaga et al., 2020).

Por otro lado, se han aislado algunos microorganismos productores de exopolisacáridos (dextranos y fructanos con diversa ramificación) del pulque como *L. mesenteroides* y *C. kimchii*. Los productos de estos microorganismos son de

interés, principalmente, como prebióticos y fuentes de fibra soluble (Escalante et al., 2016).

2.5.3 Microorganismos patógenos

El pulque se reconoce como una bebida segura para su consumo, a pesar de su producción poco controlada y artesanal, debido esencialmente al proceso de fermentación que ocurre en su elaboración.

Gómez-Aldapa et al. (2011) estudiaron la sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *S. sonnei* en aguamiel, pulque semilla y durante el proceso de fermentación hasta obtener pulque comercial. Si bien los patógenos pudieron desarrollarse tras ser inoculados en el aguamiel y alcanzaron concentraciones en el rango de 10^3 a $10^{3.5}$ UFC/mL, todos tendieron a morir y fueron indetectables (<1 UFC/mL) después de 80 horas a temperaturas de 16 °C o 22 °C (asociadas a la temperatura ambiental de la zona de producción estudiada, en este caso, Hidalgo).

Con respecto al pulque semilla, todos los microorganismos inoculados fueron rápidamente inactivados (en tiempos menores a 30 horas), lo que se asoció a la competencia con la microbiota propia del pulque, la presencia de diferentes compuestos antimicrobianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos y etanol) y a un pH menor a 4.5. De igual forma, durante el proceso de fermentación natural del aguamiel (sin adición de pulque semilla), las bacterias comenzaron a ser inhibidas una vez que el aguamiel comenzó a reducir su pH a valores cercanos a 4.0-5.0 que ocurre tras 24 horas a las temperaturas probadas por los autores (Gómez-Aldapa, et al., 2011).

En cuanto al proceso de elaboración comercial, los autores concluyeron que si el aguamiel es contaminado apenas es obtenido del cajete, todos los patógenos tendieron a desarrollarse hasta que se adicionó el pulque semilla; esta adición redujo drásticamente el número de patógenos en la bebida, garantizando su

completa ausencia en la bebida terminada (en este caso, tras 36 horas de fermentación). Es importante mencionar, sin embargo, que concentraciones elevadas de patógenos (superiores a 10^4 UFC/mL) podrían permitir la supervivencia de estos en la bebida terminada en concentraciones riesgosas para el consumo, aunque la probabilidad de que esto suceda se supone baja (Gómez-Aldapa, et al., 2011).

De interés particular resulta el estudio Gómez-Aldapa et al. (2012), donde los autores evaluaron la supervivencia de *E. coli* O157:H7 inoculada igualmente en aguamiel, pulque semilla y durante el proceso de fermentación comercial. Es importante mencionar que se requerirían condiciones muy específicas para que esta combinación sucediera (contaminación de aguamiel con excretas de ganado en la zona de recolección, por ejemplo), sin embargo, el estudio aporta un panorama intrigante con respecto a la supervivencia de este microorganismo en la bebida, aún más considerando su alta virulencia (50 células o menos pueden causar enfermedad en el ser humano). Los autores demostraron la capacidad de este patógeno para sobrevivir por más de 72 horas tanto en aguamiel como en pulque semilla. Si el patógeno contamina inicialmente el aguamiel, se desarrollará y sobrevivirá incluso tras la adición de pulque semilla y tras varios ciclos de fermentación. (Gómez-Aldapa, et al., 2012).

Giles-Gómez et al. (2016) evaluaron las características probióticas *in vivo* e *in vitro* de *L. mesenteroides* cepa 45, asilado de pulque. Este microorganismo no sólo se identificó como resistente a lisozima, sales biliares (0.1-0.3% oxgall) y pH de 3.5, sino que incluso mostró actividad antimicrobiana contra patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. entérica* serovar Typhi y *S. entérica* serovar Typhimurium. Esta actividad antimicrobiana se asoció a la probable producción de bacteriocinas y de peptidoglucano hidrolasas; en el caso de *S. entérica* serovar Typhimurium fue incluso posible demostrar una infectividad menor del patógeno en

presencia de la cepa probiótica, evaluando su concentración en órganos diana como hígado y bazo.

2.6 Características sensoriales del pulque

Como ha sido revisado, las principales características sensoriales de la bebida se pueden asociar a la presencia de etanol, ácido acético, ácido láctico y diversos exopolisacáridos, productos de una compleja fermentación del aguamiel por la actividad de diversos microorganismos. Además, estos compuestos sirven como una guía para caracterizar la bebida obtenida.

En cuanto a otras características específicas de la bebida, De León-Rodríguez et al., 2007 detectaron y caracterizaron compuestos volátiles en diferentes bebidas alcohólicas obtenidas a partir de especies de agave, empleando cromatografía de gases. En este estudio, se encontraron como principales componentes del pulque al etanol, ácido acético, alcoholes superiores (1-butanol, metil propanol y 2-pentanol, principalmente), etil acetato y fenil etanol. Asimismo, se analizaron diversos compuestos minoritarios, dentro de los cuales los autores encontraron al 3-metil-tio-1-propanol y al ácido nonanoico como compuestos exclusivamente asociados al pulque analizado. Una limitante del estudio, sin embargo, es que no menciona la zona de origen de la bebida.

Medina-Mendoza et al. (2022) propusieron una lista de descriptores para la evaluación sensorial del pulque con base en sus resultados y los lineamientos generales que brinda la NMX-V-037-1972, los que se listan en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Descriptores sensoriales propuestos para caracterizar al pulque.

Característica	Indicador de buena calidad	Indicador de defecto
Color y aspecto	Blanco espumoso y sin impurezas.	Amarillento, aguanoso, estiloso (viscoso), presencia de impurezas.
Olor	Afrutado, almendrado a maguey maduro.	Avinagrado o rezagado (agrio), brincado (pútrido), presencia de olores no característicos.
Sabor	Afrutado (melón: poco fermentado; papaya: bien fermentado), agridulce, sabor a maguey, alcohólico.	Guixi (astringente a penca tierna), ñanmfi (penca vieja), agrio, amargo, pútrido, apestoso, rezagado, aguanoso.
Resabio	Dulce, sensación a frutas, con ausencia de sabores fuertes y persistentes.	Viscoso, rasposo, rancio, putrefacto.

(Medina-Mendoza et al., 2022).

Como se ha discutido, el estudio sensorial del pulque ha sido limitado, por lo que un acercamiento más amplio, como la cromatografía de gases-MS, supone una herramienta útil para la caracterización sensorial más detallada de la bebida.

2.7 Denominación de origen bajo el esquema legal mexicano

Bajo el esquema legal mexicano, la protección a denominaciones de origen es competencia del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, el cual emplea como instrumento legal a la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial.

Con base en este instrumento legal, en su título quinto, se entiende a una denominación de origen como sigue:

“Producto vinculado a una zona geográfica de la cual éste es originario, siempre y cuando su calidad, características o reputación se deban exclusiva o esencialmente al origen geográfico de las materias primas, los procesos de producción, así como los factores naturales y culturales que inciden en el mismo” (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2020; Gobierno de México, 2023).

El producto, una vez protegido, deberá contar con una Norma Oficial Mexicana específica y pasará a considerarse un bien nacional hasta que dejen de persistir las condiciones que la motivaron (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2020; Gobierno de México, 2023).

La declaración de origen puede ser solicitada, con base en el artículo 273 del ordenamiento actualmente analizado, por diversos solicitantes como personas físicas o morales, cámaras o asociaciones productoras, dependencias gubernamentales federales o locales y por la Cámara del Congreso de la Unión. Dicha solicitud deberá incluir, según el artículo 274:

- Datos del solicitante.
- Carácter, naturaleza jurídica y actividades a las que se dedica.
- Nombre de la denominación de origen.
- Estudio técnico emitido por una autoridad o institución que contenga los siguientes aspectos:
 - Descripción detallada del producto.

- Lugares de producción del producto y la delimitación geográfica.
- Señalamiento detallado de los vínculos nombre-producto-zona geográfica-factores naturales-factores humanos.
- Criterios que establezcan especificaciones y características del producto a lo largo de su producción.
- Normas Oficiales Mexicanas que guiarán su extracción y producción.
- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, 2020).

Bajo lo expuesto hasta el momento, es posible apreciar que el pulque podría adquirir una denominación de origen, lo anterior podría traducirse en un reconocimiento a la bebida con producción exclusiva en el centro de México, que emplea ciertas materias primas de la región (magueyes o agaves del género *Agave* L.), bajo un proceso de elaboración que implica una fermentación que emplea microorganismos presentes naturalmente en la región y que la bebida es heredera de una tradición milenaria del centro de México.

De esta forma, dado que Querétaro se encuentra entre las principales regiones productoras de pulque y maguey pulquero, aunado a un discreto estudio de la región desde múltiples perspectivas (microbiológicas, físicas y químicas) y la influencia propuesta que puede tener el nicho geográfico (considerando las particularidades regionales de producción, entre otros factores) en las características de la bebida, se supone relevante no sólo estudiar la región productora, sino aportar nuevas herramientas para el estudio de esta matriz fermentada, tratando de representar su producción artesanal.

Lo anteriormente propuesta se plantea integrando tanto perspectivas de estudios recientes, como proponiendo acercamientos novedosos que permitan aportar herramientas para el estudio de la bebida. De esta forma, el estudio de las características físicas, microbiológicas y químicas de la bebida, en conjunto con

estudios de microbiota y análisis de volátiles, suponen herramientas (tanto en común como novedosas con respecto a otros estudios) que facilitarán tratar de definir la bebida producida en la región, permitirán su comparación con otras regiones productoras y generarán información novedosa que podrá servir de base para ampliar el estudio de la bebida. El presente trabajo permitirá generar información que, en conjunto con otros estudios, facilitarán la actualización de la legislación aplicable, aportarán elementos para una futura categorización de la bebida (en la forma de una denominación de origen) y dará herramientas para estandarizar la bebida en un futuro.

3. Objetivos

3.1 General

Caracterización física, química, de la microbiota y compuestos asociados al aroma del pulque y aguamiel.

3.2 Específicos

- Determinar las características físicas y químicas del pulque joven, iniciador de la fermentación y aguamiel producido en Querétaro (viscosidad, pH, acidez total, contenido de etanol y ácido acético, azúcares reductores y compuestos volátiles).
- Determinar las características microbiológicas del aguamiel, iniciador de la fermentación y pulque joven mediante el análisis de los grupos indicadores coliformes totales, levaduras y bacterias ácido lácticas.
- Identificar la microbiota presente en las distintas etapas de elaboración del pulque producido en Querétaro.

4. Material y métodos

4.1 Recolección de muestras

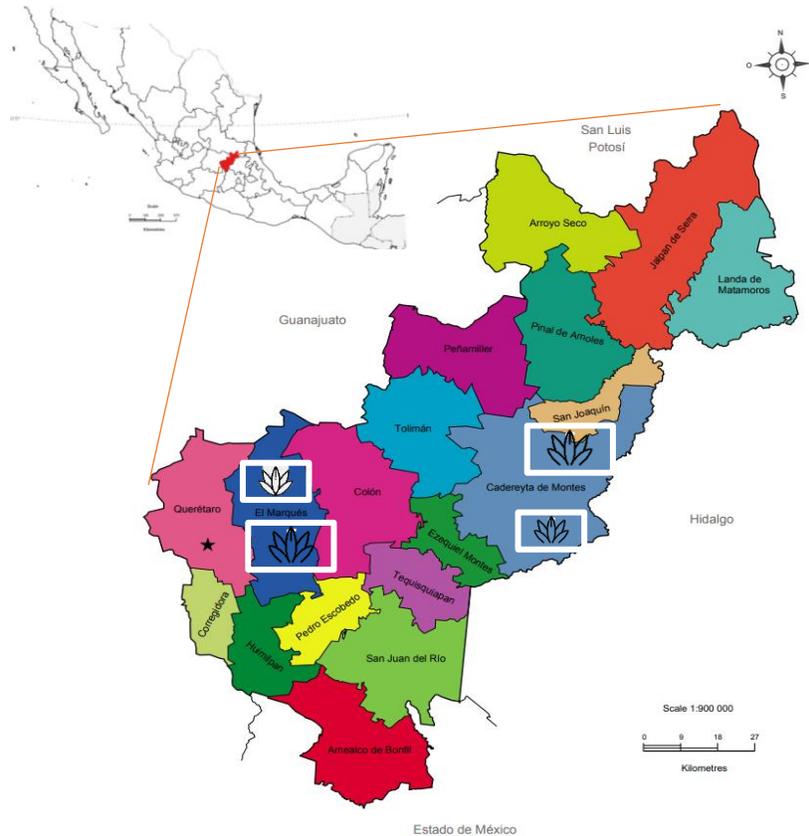
A través de muestreo homogéneo por conveniencia según lo descrito por Jager et al. (2017) y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (1972 a; 1972 b), se recolectaron directamente con productores pulque comercial o “joven” (PY), iniciador de la fermentación (pulque obtenido tras fermentación de trasnoche, PS) y aguamiel (A). Las muestras fueron recolectadas durante la temporada cálida de producción de julio a septiembre de 2023, muestreando tres diferentes especies del género *Agave* empleadas en cinco diferentes instalaciones productoras, todas localizadas en los municipios de El Marqués y Cadereyta de Montes, en la región del semi desierto del estado de Querétaro (Figura 5) (SIAP, 2021 b).

Cada estación fue muestreada al mediodía, dos veces durante la temporada, de acuerdo con la disponibilidad del productor. La localización, fecha de muestreo y especie de *Agave* muestreadas se presentan en el Cuadro 11 tanto para aguamiel como para pulque joven e iniciador de la fermentación. En cada muestreo se registró la temperatura de cada matriz y las características de la fermentación (proporción de mezcla de aguamiel con iniciador de fermentación, tiempo y proceso de fermentación), esta última entrevistando directamente a cada productor o *tlachiquero*.

Aproximadamente 300 mL de cada muestra fueron recolectados empleando las herramientas de cada productor en cada visita (100 mL en tres bolsas plásticas estériles) y almacenadas en una hielera con geles congelados hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, una bolsa fue inmediatamente almacenada a -20 °C hasta los análisis físicos y químicos, mientras que las otras dos fueron inmediatamente procesadas para los análisis microbiológicos y de microbiota.

Para el análisis de componentes volátiles, se recolectó por triplicado 5 mL de pulque como reporta Arcanjo et al. (2015) con algunas modificaciones. Se recolectaron 5

mL de pulque en viales HS crimp RB 20 mL clr cert 100 PK (Agilent, California, EE. UU.) (emulando aproximadamente la proporción de 1 mL de muestra por 3 mL de capacidad de envase, como establecido en la referencia), para posteriormente sellar, engargolar y congelar cada uno en hieleras con geles congelados. Después, las muestras se trasladaron en una hielera y se almacenaron en congelación convencional (-20 °C) hasta su análisis.



www.cuentame.inegi.org.mx
Fuente: INEGI, Marco Geoestadístico, diciembre 2018.

Figura 5. Localización de Querétaro y las respectivas instalaciones productoras, marcadas por símbolos de Agave (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018; Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 a).

4.2 Análisis físicos y químicos del aguamiel y pulque recolectado

4.2.1 Acidez titulable

A 5 mL de cada matriz se le adicionaron 5 mL de agua destilada en un vaso de precipitados y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se tituló cada dilución con NaOH 0.1 N, determinando el final de la titulación con fenolftaleína 1% (p/v). Se expresa como g ácido láctico/100 mL de matriz. Se realizó por duplicado.

4.2.2 Contenido de carbohidratos

4.2.2.1 Contenido de carbohidratos reductores directos

Se llevó a cabo únicamente para las muestras de pulque (semilla o iniciador y joven) por duplicado, empleando el método Fehling Causee Bonnans (FCB) con una dilución y clarificación previa de acuerdo al método OIV-MA-AS311-01A (International Organization of Vine and Wine, 2022) con algunas modificaciones como sigue: 50 mL de una dilución 1:2 (v/v) con agua destilada para cada matriz se mezcló con 8 mL de acetato de plomo 25% (p/v) y 0.5 g de carbón activado, para luego aforar a 100 mL con agua destilada y finalmente filtrar con papel filtro.

Un volumen de 10 mL de solución FCB (previamente titulada con una solución estándar de glucosa 1 g/L), se mezclaron con 30 mL de agua destilada, se ebulleron y titularon con las soluciones previamente preparadas con las muestras (clarificadas y filtradas), siguiendo las indicaciones de De Angelis-Juanicó, n.d. para estimar el contenido de dextrosa en cada matriz como g dextrosa/ 100 mL muestra.

4.2.3 Determinación de pH

Se empleó un potenciómetro pH 211 (Hannah Instruments, Rhode Island, EE. UU.) calibrado en dos puntos y se determinó por duplicado para cada matriz.

4.2.4 Sólidos solubles totales

Se determinaron por duplicado en las tres matrices, empleando un refractómetro de mano (ARIANA).

4.2.5 Viscosidad

La viscosidad de todas las muestras se evaluó con 15 mL de muestra en un reómetro Brookfield DV3T dentro del rango de flujo laminar (menor a 60 rpm para el adaptador UL empleado en el equipo) y con un % torque lo más cercano a 10%. Se realizó la determinación por duplicado.

Cuadro 11. Fecha de muestreo, precipitación, tipo de suelo y especie de Agave asociada a cada estación muestreada para aguamiel, pulque joven e iniciador de la fermentación.

Estación muestreo	Código	Ubicación	Especie de Agave ^d	Tipo de suelo	Precipitación media anual ^f	Fecha de muestreo
1	1.1	El Lobo, El Marqués, Querétaro ^a	<i>A. americana</i>	Phaeozem, vertisol y leptosol	334.4 mm	11/07/2023
	1.2					19/09/2023
2	2.1	Boyé, Cadereyta de Montes, Qro. ^b	<i>A. salmiana</i>	Vertisol, calcisol, leptosol, lluvisol y phaeozem	334.4 mm	18/07/2023
	2.2					8/08/2023
3	3.1	Boyé, Cadereyta de Montes, Qro. ^b	<i>A. salmiana</i>	Vertisol, calcisol, leptosol, lluvisol y phaeozem	334.4 mm	25/07/2023
	3.2					12/09/2023
4	4.1	El Lobo, El Marqués, Qro. ^a	<i>A. mapisaga</i>	Phaeozem, vertisol y leptosol	334.4 mm	1/08/2023
	4.2					5/09/2023
5	5.1	Charco Frío, Cadereyta de Montes, Qro. ^c	<i>A. mapisaga</i>	Vertisol, calcisol, leptosol, lluvisol y phaeozem	334.4 mm	22/08/2023
	5.2 ^e					29/08/2023

^a[20.7275 N 100.2013 W], 2.010 ms.n.m. (Google Earth, n.d. a); ^b [20.6830 N 99.7347 W], 2,083 ms.n.m (Google Earth, n.d. b); ^c [20.7906 N 99.7017 W], 2,130 ms.n.m. (Google Earth, n.d. c). ^d El aguamiel se muestreó de plantas productoras maduras; estas reciben sólo agua de temporal. ^e El iniciador de fermentación de la estación 5.2 fue vendido por el productor y no fue posible por lo tanto analizarlo; ^f Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b.

4.2.6 Análisis de compuestos volátiles, etanol y ácido acético

Los componentes volátiles presentes en las muestras de pulque joven fueron identificados empleando micro extracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME, por sus siglas en inglés) acoplado a cromatografía de gases y espectrometría de masas. Tras descongelar los viales, las muestras fueron incubadas a 50 °C por una hora con agitación de 200 rpm, para inyectar una fibra SPME FiberDivinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) de 2 cm (Sigma Aldrich, Massachusetts, EE. UU.). La fibra fue des adsorbida a 250 °C en modo *splitless* en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, California, EE. UU.) con una columna capilar *Heavy Wax* (60 m x 250 µm de diámetro, 0.25 µm de grosor de fase; Agilent Technologies, California, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar 5975C VL (Agilent Technologies, California, EE. UU.). Las especificaciones del programa de temperatura fueron: 40°C/10 min, seguidos primero por un incremento a 3 °C/min. hasta 140 °C mantenidos por 20 minutos, incrementando después a 3 °C/ min. hasta 220 °C y manteniendo por 5 minutos, finalizando con un incremento de 10 °C/min. hasta 260 °C y sosteniendo por 15 minutos. Helio (99.99% (v/v)) fue empleado como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min.. El espectrómetro de masas fue ajustado a 70 eV para el modo de impacto electrónico con un factor Gain de 1, temperatura de línea de transferencia de 280 °C, fuente de ionización de 230 °C y cuadrupolo de 150 °C. Un modo de escaneo de 33-600 u fue empleado. La identificación tentativa de compuestos se realizó comparando espectros contra la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés; versión 2017). Se empleó un umbral de identidad de 70% para la identificación de compuestos.

Se cuantificaron ácido acético y etanol en pulque joven por triplicado (empleando curvas de calibración), siguiendo un método interno (metodología de espacio de

cabeza estático), disponible para la cuantificación de estos compuestos en el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada-Querétaro. Instituto Politécnico Nacional, donde se llevaron a cabo también los análisis de compuestos volátiles. En breve, se recolectaron 10 μ L de pulque por triplicado en viales HS crimp RB 20 mL clr cert 100 PK (Agilent, California, EE. UU.), registrando el peso de la muestra depositada en su interior (hasta cuatro cifras significativas). Posteriormente, éstos fueron sellados, engargolados y mantenidos en congelación hasta su análisis (-20 °C). Las muestras fueron descongeladas previo a su análisis a temperatura ambiente e incubadas a 50 °C por 1 hora con 200 rpm de agitación, para inyectar una fibra SPME FiberDivinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) de 2 cm (Sigma Aldrich, Massachusetts, EE. UU.). La fibra se des adsorbió a 250 °C en modo *splitless* en puerto de inyección del equipo de cromatografía.

El análisis conjunto de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, California, EE. UU.) con una columna capilar *Heavy Wax* (60 m x 250 μ m de diámetro, 0.25 μ m de grosor de fase; Agilent Technologies, California, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar 5975C VL (Agilent Technologies, California, EE. UU.). Las especificaciones del programa de temperatura fueron: 40 °C/ 10 min., seguidos de un incremento a 3 °C/min. hasta 140 °C mantenidos por 20 minutos, seguidos de un incremento a 3 °C/min. hasta 220 °C mantenidos por 5 minutos, concluyendo con un incremento de 10 °C/min hasta 260 °C manteniendo por 15 minutos finales. Se empleó helio (99.99 % (v/v)) como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. El detector de masas fue ajustado a 70 eV para el modo de impacto electrónico con un factor Gain de 1 y temperaturas para la línea de transferencia de 280 °C, para la fuente de ionización de 230 °C y para el cuadrupolo de 150 °C. Un modo de escaneo de 33-600 u fue empleado. La identificación tentativa de compuestos se realizó comparando el espectro obtenido con espectros de referencia en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares

y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés; versión 2017). Se empleó un umbral de identidad del 70% para la identificación de compuestos.

4.3 Análisis de la calidad microbiológica de aguamiel, semilla y pulque recolectados

En las diferentes matrices recolectadas (y el mismo día de muestreo), se analizaron bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias coliformes totales. Para bacterias ácido lácticas y levaduras, 10 mL de cada muestra fueron diluidos en 90 mL de solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS, [1.0 M], pH=7.2) (Karal S.A. de C.V., Guanajuato, México) y diluciones decimales seriadas se prepararon con solución salina estéril NaCl (0.85% (m/v)) (Karal S.A. de C.V., Guanajuato, México). Para bacterias coliformes totales, sólo una dilución 1:1 con PBS usando 5 mL de muestra fue analizada para pulque joven e iniciador de fermentación; mientras que, para aguamiel, una dilución 1:1 (con 5 mL de aguamiel), dilución 1:4 (con 1 mL de aguamiel) y dilución 10^{-1} se elaboraron con PBS.

4.3.1 Bacterias ácido lácticas, coliformes totales y levaduras

En el Cuadro 12 se presentan el volumen de muestra empleado, rango cuantificable, el medio y técnica de cultivo y las condiciones de incubación para cada grupo microbiano cuantificado.

Cuadro 12. Técnica y medio de cultivo, volumen de muestra empleado, rango cuantificable y condiciones de incubación para la cuantificación de bacterias ácido lácticas, coliformes totales y hongos y levaduras.

	Bacterias ácido lácticas ^a	Coliformes totales ^b	Levaduras ^c
Volumen cultivado de una dilución dada (mL)	0.1	1	1
Medio de cultivo empleado	Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) adicionado con cicloheximida 100 ppm (Neogen Corporation, Michigan, EE. UU.)	Rojo Violeta Bilis Agar (RVBA) (Becton Dickinson, Nueva Jersey, EE. UU.).	Agar papa dextrosa acidificado con 1.4 % (v/v) de ácido tartárico al 10 % (p/v)
Técnica de cultivo	Extensión superficial con perlas de vidrio	Vertido en placa	Vertido en placa
Rango cuantificable (UFC)	25-250 UFC	15-150, contando sólo colonias típicas según Secretaría de Salud (b), 1994.	10-150
Condición de incubación	30 °C, 48 h.	35 °C, 48 h.	30 °C, 3 días.
En todos los casos se analizan también controles de esterilidad de diluyentes y medio de cultivos empleados; a: Secretaría de Salud, 1994 c; b: Secretaría de Salud, 1994 b; c: Secretaría de Salud, 1994 a.			

4.4 Análisis de la diversidad microbiana por medio de secuenciación de siguiente generación de la región ribosomal V3-V4 bacteriana e ITS1-5F fúngica

4.4.1 Obtención de poblaciones microbianas del aguamiel y del pulque

En la misma fecha de muestreo, alícuotas de 1.5 mL de cada muestra fueron centrifugados a 9,580 g por 20 minutos, según Astudillo-Melgar et al., 2023, por cuadruplicado. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y se añadieron a cada tubo de micro centrífuga 1.5 mL de caldo Soya Trypticasa (TSB, por sus siglas en inglés) frío (Beckton Dickinson, Nueva Jersey, EE. UU.) con 8% (v/v) de glicerol para re suspender el pellet. Las muestras fueron después congeladas a -20 °C hasta la extracción de ADN.

4.4.2 Extracción de ADN y secuenciación de siguiente generación de los amplicones 16S/ITS

Únicamente se extrajo ADN para los muestreos 2.1, 3.1, 4.1 y 5.1 (referirse a Cuadro 11 para más detalles). Para la extracción de ADN, se empleó el kit Zymobionics DNA Miniprep (Zymo Research Corp., California , EE. UU.), de acuerdo a las indicaciones del proveedor con menores consideraciones, como sigue: 4.5 mL de caldo TSB con 8% (v/v) de glicerol (conteniendo 4.5 mL de muestra), se le añadió lisozima A para lograr una concentración de 0.8 mg/mL solución, se incubó a 37 °C por 1 hora, previo a la extracción del ADN siguiendo las indicaciones del kit (la lisis física se realizó empleando un Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, EE. UU.) por 5 minutos como el kit recomienda). La integridad del ADN extraído se evaluó en gel de agarosa 1% (m/v) y se cuantificó empleando tanto Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) como el fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Se resguardó en congelación (-20 °C) el ADN obtenido de las extracciones realizadas.

Las muestras de ADN fueron secuenciadas por Novogene (Novogene Corporation Inc., California, EE. UU.) en un secuenciador Illumina NovaSeq, generando lecturas

pareadas (o *paired-end*, en inglés) de 250 pb. El proveedor preparó las librerías para los amplicones V3-V4 e ITS1-5F, siguiendo protocolos Illumina. La región del gen ribosomal bacteriano 16S V3-V4, fue amplificada empleando los primers 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGGTATCTAAT), mientras que para la región ribosomal fúngica ITS1-5F se emplearon los primers 1737F (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) y 2043R (GCTGCGTTCTTCATCGATGC). Ambas reacciones de PCR se llevaron a cabo por el proveedor. Las lecturas crudas de cada muestra pueden consultarse en el BioProject PRJNA1137936 del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) a partir de febrero de 2025.

4.5 Análisis estadístico, bioinformático y visualización de datos

Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) acoplado a un agrupamiento por K-medias fue realizado según lo descrito por James et al., (2023) en R Studio (v4.3.3; R Core Team, 2022). Tres diferentes PCA con su respectivo análisis de agrupamiento se elaboraron para cada una de las matrices estudiadas, usando parámetros físicos, químicos y microbiológicos relevantes que permiten definir a cada matriz: °Brix, pH, viscosidad (*viscosity*), acidez titulable (*acidity*), bacterias ácido lácticas (*lacticbacteria*) y levaduras (*yeasts*) para aguamiel; viscosidad, carbohidratos reductores directos (*reducingcarbs*), acidez titulable, pH, °Brix, bacterias ácido lácticas y levaduras para el iniciador de la fermentación; mientras que para pulque joven se emplean los mismos parámetros que el iniciador, pero considerando además el contenido de etanol (*etanol*) y ácido acético (*aceticacid*).

Para la visualización de datos, se empleó el paquete de R ggplot2 (v3.5.0; Wickham, 2016). Para la creación del mapa de calor para el análisis de compuestos volátiles, se empleó R con los siguientes paquetes: dbplyr (v2.5.0; Wickham, et al., 2023 b), ggplot2 (v3.5.0; Wickham, et al., 2016), plyr (v1.8.9; Wickham, 2011), scales (v1.3.0; Wickham, et al., 2023 a) y reshape2 (v1.4.4; Wickham, 2020).

Para el análisis de las lecturas de las secuencias asociadas a las regiones V3-V4 e ITS1-5F, se empleó QIIME2 (v2024.5; Bolyen et al., 2019) en Ubuntu 22.04.4 como sigue: las lecturas crudas (lecturas tanto *forward* como *reverse* sin índices ni primers) se importaron y convirtieron en artefactos de QIIME2 según el formato “Manifest”. Como se mencionó, las lecturas fueron ya identificadas para cada muestra por el proveedor (*demultiplexed*). El análisis de calidad de las lecturas se efectuó con FastQC (v0.11.9; Andrews, 2010) y QIIME2. Las lecturas fueron filtradas, secuencias quiméricas removidas, recortadas (con base en el análisis previo de calidad) y finalmente ensambladas con DADA2 en QIIME2 (Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016; McDonald et al., 2012). Las especificaciones de corte tanto para las lecturas *forward* como *reverse* fueron: para ITS1-5F se removieron las primeras 9 y últimas 4 posiciones, mientras que para V3-V4 se removieron únicamente las primeras 9 posiciones. Las secuencias ensambladas fueron de un tamaño de entre 270-390 pb para ITS1-5F y de aproximadamente 400 pb para V3-V4. No se realizó ningún agrupamiento (*clustering*) y las secuencias procedieron a su análisis como Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV, por sus siglas en inglés).

Para la identificación bacteriana, se entrenó un clasificador tipo Aprendizaje Automático (*Machine Learning Based*) “classify-sklearn” Naive Bayes con la base de datos SILVA (SILVA 132) con una referencia del rango de 99% de similitud y extrayendo las lecturas de referencia a las regiones amplificadas usadas en este estudio; mientras que para la identificación fúngica, también se entrenó un clasificador tipo Aprendizaje Automático (*Machine Learning Based*) “classify-sklearn” Naive Bayes con la base de datos UNITE (v10.0), usando el set “dinámico” para una clasificación de taxones con rango de similitud variable (en función del taxón) y sin extraer las lecturas de referencia a la región amplificada en este estudio (Bolyen et al., 2019; Borkulich et al., 2018; Coordinators, 2017; Pedregosa et al., 2011; McKinney, 2010). Aquellos microorganismos o secuencias que no les fue posible una asignación a nivel de género por alguna de las dos bases de datos

empleadas, fueron individualmente analizadas empleando la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (BLAST, por sus siglas en inglés) del NCBI.

La diversidad alfa fue evaluada en cada matriz usando los métricas de diversidad Shannon-Wiener, Simpson y Chao1 (Bolyen et al., 2019; Callahan et al., 2016; Kruskal & Wallis, 1952; McDonald, et al., 2012; McKinney, 2010; Shannon, 1948). La diversidad beta fue evaluada por medio de la matriz del indicador Jaccard, generando un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) con QIIME2 (Bolyen et al., 2019; Debelius, 2023; Halko et al., 2011; Jaccard, 1908; Kato & Standley, 2013; Lane, 1991; Legendre & Legendre, 2012; McDonald et al., 2012; McKinney, 2010; Price et al., 2010; Vázquez-Baeza et al., 2013; Vázquez-Baeza et al., 2017; Weiss et al., 2017). El análisis completo de las secuencias se encuentra disponible en el repositorio GitHub (<https://github.com/marcovt28/Amplicon-Analysis-QIIME2-2024.5/tree/main>).

5. Resultados y discusión

5.1 Características de producción en la región de estudio

La región productora queretana de pulque, correspondiente a los municipios de Cadereyta de Montes, Tolimán, Colón, Ezequiel Montes y Peñamiller (según datos oficiales disponibles en SIAP, 2021 b; SIAP, 2022; SIAP, 2023), corresponde a una región principalmente semi desértica, con una precipitación promedio total anual de entre 333.4 mm hasta 538 mm y con una temperatura ambiental promedio de 24.6 °C en verano (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021 b).

La temperatura y las características de la fermentación se encuentran en el Cuadro 13 en cada estación de muestreo. La temperatura promedio registrada en cada matriz al momento de su recolección (llevada a cabo cerca del mediodía) fue de 23.1 °C ± 2.2 °C en las cinco estaciones de muestreo.

Con respecto a la fermentación del aguamiel para producir pulque joven, todos los productores mezclan aguamiel con pulque de trasnoche (iniciador de la fermentación) en una fermentación en lote, en las proporciones listadas en el Cuadro 13. Particular atención merece el caso de Charco Frío (estación productora 5), donde si bien se lleva a cabo una fermentación en lote, esta muestra particularidades: una proporción definida de iniciador se añade a aguamiel y se deja fermentar por periodos prolongados de tiempo para producir pulque joven, el cual se va retirando del contenedor. En este sentido, el pulque empleado como iniciador de la fermentación conlleva un periodo previo de fermentación igualmente prolongado para su elaboración. Asimismo, esta región productora mostró la menor temperatura registrada al momento del muestreo (Cuadro 13) en todas las muestras. Como se tenía previsto, se registraron diferentes tiempos de fermentación al momento de los muestreos, derivado del itinerario particular de cada productor el día de su visita.

Cuadro 13. Temperatura de muestreo para cada matriz y características de fermentación registradas en cada estación de muestreo.

Código ^a	Temperatura de muestreo (°C)			Características de fermentación		
	Aguamiel	Pulque joven	Iniciador de fermentación	Pulque joven		Iniciador de fermentación
				Proporción aguamiel-iniciador de fermentación (aguamiel:iniciador)	Tiempo de fermentación	Tiempo de fermentación
1.1	24.9	22.5	20.8	4:6	1.5 h	Trasnoche
1.2	23.1	21.5	20.6	4:6	5 h	Trasnoche
2.1	25.5	25.1	24.6	No conocido por el productor	5 h	Trasnoche
2.2	26.1	25.3	25.3	1:2	0.5 h	Trasnoche
3.1	25.0	25.0	24.9	4:7	6 h	Trasnoche
3.2	21.3	26.1	25.5	4:7	1.5 h	Trasnoche
4.1	23.0	24.5	22.1	1:1	5 h	Trasnoche
4.2	22.3	21.9	21.8	1:1	2 h	Trasnoche ^b
5.1	19.8	19.9	19.6	1:2	3 semanas	1 mes
5.2	20.7	21.3	No muestreado	1:2	4 semanas	No muestreado

^a: para detalles, referirse a Cuadro 11; ^b: este iniciador fue adquirido por el productor local al productor de la estación de muestreo 2 y fue elaborado con *A. salmiana*.

Ninguna particularidad se registró con respecto al manejo de la planta en las estaciones visitadas de la región en cuanto al corte del quiate de la planta, la creación de la cavidad central o cajete y la estrategia de raspado, es decir, en la

región de estudio se castran agaves maduros previo a la salida del quiote, creando un cajete en el centro de la planta y raspando inmediatamente para estimular la salida de aguamiel. En cuanto a la recolección de aguamiel, sólo un productor (estación productora 3, Boyé, Cadereyta de Montes) emplea una herramienta plástica para emular un acocote (fruto seco de *Langenaria siceraria*), el cual funge como una pipeta para extraer el aguamiel del *Agave*, mientras que el resto de los productores emplea herramientas plásticas para este fin para después resguardar el aguamiel en contenedores plásticos hasta su empleo en la fermentación (Álvarez-Ríos et al., 2020; Escalante et al., 2016; Medina-Mendoza, et al., 2022).

Con respecto a la fermentación del aguamiel para crear pulque joven, algunas diferencias fueron detectadas en la estrategia para la fermentación, en cuanto al tiempo y la forma en que esta inicia en comparación con otras regiones productoras de pulque. Con respecto al tiempo de fermentación, este varía entre productores dentro de la región de estudio y resalta la complejidad inherente a la bebida, asociado a su origen artesanal común en regiones rurales, donde justamente la bebida es principalmente producida (García-Arce & Castro-Muñoz, 2021). Sólo un productor (estación de muestreo 5, Charco Frío, Cadereyta de Montes) fermenta por periodos prolongados de tiempo. Para el resto de estaciones de muestreo (estaciones de muestreo 1, 2, 3 y 4 ubicadas en El Lobo, El Marqués; y Boyé, Cadereyta de Montes) fermentan por tiempos similares a los reportados en Michoacán o Morelos (menos de 6 horas) (Álvarez-Ríos et al., 2020; Astudillo-Melgar et al., 2023; Chacón-Vargas et al., 2020), pero menores a los reportados en la región del Alto Mezquital en Hidalgo por Medina-Mendoza et al. (2022). Con respecto a la fermentación, existen similitudes en su ejecución con respecto a lo reportado en Hidalgo y Morelos, aunque no con Michoacán donde el iniciador de la fermentación se añade en forma “concentrada” (residuo semi sólido obtenido tras las primeras fermentaciones) y que no emplea una proporción de aguamiel:iniciador definida. Con respecto a la proporción de aguamiel:iniciador/semilla mezclado en otras regiones, únicamente es comparable en proceso y proporciones con las

reportadas en Morelos, reportándose proporciones aguamiel:iniciador 2:3 v/v (Astudillo-Melgar et al., 2023; Chacón-Vargas et al., 2020) El resto de las regiones comparadas carecen de una proporción reportada o el proceso para iniciar la fermentación del pulque joven es diferente, como en Álvarez-Ríos et al. (2020). En este sentido, el iniciador de la fermentación presenta similitudes en su preparación (forma y tiempo) con lo reportado en Michoacán y Morelos, pero diferente a lo reportado en Hidalgo con relación a su tiempo de fermentación (Álvarez-Ríos et al., 2020; Astudillo-Melgar et al., 2023; Chacón-Vargas et al., 2020; Medina-Mendoza et al., 2020).

Aunque existen evidentes diferencias entre las regiones productoras muestreadas, el presente estudio provee un acercamiento integral para su entendimiento, en el entendido de poder aportar herramientas para una definición integral futura de la bebida.

5.2. Descripción de la producción en la región

Los Cuadros 14, 15 y 16 muestran los valores promedio y límites legales para cada parámetro físico, químico y microbiológico determinado en cada matriz y estación de muestreo. Los resultados con desviaciones estándar se muestran en el Anexo I.

Con respecto a los límites legales sugeridos para cada matriz por las normativas de calidad respectivas, el aguamiel muestreado cumple con ellos excepto en acidez titulable, donde ninguna muestra entró dentro del intervalo sugerido. También en otros estudios, este parámetro queda fuera de la recomendación legal, por lo que sería prudente hacer una revisión de la norma de referencia (Álvarez-Ríos et al., 2020; Medina-Mendoza et al., 2022; Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972-a; Valadez-Blanco et al., 2012). Para el iniciador de la fermentación, no todas las muestras cumplen con las recomendaciones legales (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972-b) para pulque tipo I. Esto se podría atribuir a la inherente heterogeneidad de esta matriz, descrita tan sólo para nuestra región de estudio

como “fermentación de trasnoche”. Finalmente, para pulque joven, dentro de los parámetros que analiza la legislación aplicable, únicamente el intervalo para acidez titulable no resulta confiable para poder clasificar a la matriz como pulque tipo II, situación que se presenta incluso en pulque joven asociado a otras regiones (Álvarez-Ríos et al., 2020; Medina-Mendoza et al., 2022; Valadez-Blanco et al., 2012).

Cuadro 14. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para aguamiel muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes.		Boyé, Cadereyta de Montes.		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
Especie de Agave muestreado	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Viscosidad (cP)	2.28	1.28	2.00	1.84	1.78	1.63	2.08	1.55	1.32	1.47
Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	0.160	0.025	0.131	0.099	0.180	0.112	0.119	0.027	0.063	0.058
Límite legal de acidez (g ácido láctico/100 mL) ^b	0.0009-0.004									
pH	4.90	8.15	6.40	4.84	4.38	5.86	4.70	6.44	7.41	6.70
Límite legal pH ^b	4.50-7.50									
°Brix (g sólidos solubles /100 mL)	11.00	12.50	15.50	13.50	14.00	14.00	15.00	15.00	12.00	12.00
Límite legal sólidos totales (g/100 mL) ^b	7-17									

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Bacterias ácido lácticas ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	7.9	6.3	6.7	7.2 V.E.	6.5	7.5	8.4	6.9	7.4	6.6
Coliformes totales ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	2.3	2.3	2.00	2.2	1.2	1.7	1.7	1.8	1.32 V.E.	>2.5
Levaduras ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	4.4	4.5	4.7	4.2	4.7	4.4	4.2	5.0 V.E.	4.0	3.7 V.E.

a: Para los resultados microbiológicos, V.E. indica valor estimado. b: con base en NMX-V-022-1972 (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 a). Se expresa un único intervalo que abarca las denominaciones tipo I y tipo II de aguamiel.

Cuadro 15. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el iniciador de la fermentación muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes		
	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>		
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2	
Viscosidad (cP)	1.40	1.44	1.46	1.50	1.70	1.72	1.89	1.81	1.45	No muestreado	
Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	0.51	0.45	0.43	0.38	0.30	0.47	0.45	0.41	0.28		
Límite legal de acidez (g ácido láctico/100 mL) ^c	0.40-0.75										
Carbohidratos reductores directos (g equivalentes de dextrosa/100 mL) ^a	0.13	2.00	<0.12	<0.104	1.48	2.3	0.28	0.23	0.16		
pH	4.14	3.51	3.91	3.58	3.83	3.80	3.90	3.62	3.88		
Límite legal de pH ^c	3.70-4.20										
°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	4.00	5.00	5.00	5.00	6.00	7.00	8.00	6.50	4.00		
Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/mL))	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3		
Bacterias ácido lácticas (log ₁₀ (UFC/mL)) ^b	6.4	5.5	5.4	6.3 V.E.	6.8	7.6	7.4	7.3	6.7		
Levaduras (log ₁₀ (UFC/mL))	7.5	7.0	7.4	6.3	7.2	5.7	7.4	7.5	5.5		

a: Algunas determinaciones, por la naturaleza de la determinación, no fue posible obtener suficiente muestra para evaluar dos submuestras. Más detalles en Anexo I. b: V.E. indica valor estimado. c: con base en NMX-V-037-1972 (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b). Se expresa el intervalo para la denominación tipo I.

Cuadro 16. Resultados y límites legales aplicables para parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el pulque joven muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes.		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Viscosidad (cP)	1.50	1.44	1.46	1.56	1.56	1.64	2.02	1.78	1.44	1.49
Acidez titulable (g ácido láctico /100 mL)	0.36	0.36	0.32	0.24	0.30	0.26	0.47	0.34	0.26	0.37
Límite legal de acidez (g ácido láctico/100 mL) ^d	0.40-0.70									
Carbohidratos reductores directos (g equivalentes de dextrosa/100 mL) ^a	0.31	2.20	2.30	2.80	1.69	2.10	2.30	1.80	0.26	<0.10
pH	4.25	3.72	4.15	3.96	3.85	4.10	3.98	3.71	3.88	3.52
Límite legal de pH _d	3.50-4.00									
°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	4.00	5.00	7.00	7.00	7.00	9.00	9.00	7.50	4.00	4.00

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
Especie de <i>Agave</i> muestreada	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
% Etanol (% (v/v))	1.63	1.90	2.21	1.71	1.10	1.07	2.12	1.87	1.76	1.40
Límite legal de etanol (% (v/v)) ^d	0.6-4.0									
Ácido acético (mg/100 mL) ^b	0.01	0.01	0.01	0.01	0.67	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/mL)) ^c	1.0	1.0	<0.3	1.2 V.E.	<0.3	1.8	<0.3	0.8	<0.3	<0.3
Bacterias ácido lácticas (log ₁₀ (UFC/mL))	5.9	5.8	6.6	7.5	7.7	9.3	8.0	7.9	6.7	6.0
Levaduras (log ₁₀ (UFC/mL)) ^c	7.8	6.5	6.9	6.20	6.8	5.0 V.E.	7.1	7.0	5.1	5.0

a: Algunas determinaciones, por la naturaleza de la técnica Fehling Causse Bonnans, no fue posible obtener suficiente muestra para evaluar dos submuestras. Más detalles en Anexo I. b: 0.01 mg/100 mL, límite de detección. c: V.E., valor estimado. d: con base en NMX-V-037-1972 (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1972 b). Se expresa un único intervalo que abarca las denominaciones tipo II.

Todas las muestras recolectadas en la región cumplen con los intervalos propuestos para etanol, mientras que para pH sólo tres muestras no entran dentro de las recomendaciones legales. Con respecto a estos dos últimos parámetros, dentro de la región muestreada, no se encontró una clara relación entre un periodo extendido de fermentación y un mayor contenido de etanol o un menor pH, lo cual puede indicar ya algunas diferencias a nivel de diversidad microbiana entre muestras.

En resumen, la viscosidad no necesariamente incrementa en las etapas más avanzadas de la fermentación, probablemente relacionado con la dinámica microbiana en las muestras, ya que un aumento en la viscosidad ha sido asociado a una mayor presencia ya sea de *Leuconostoc mesenteroides* o *Zymomonas mobilis* y se asocia típicamente a un mayor tiempo de fermentación (Escalante et al., 2008; Escalante et al., 2016). Existe en general un incremento en la acidez en las matrices más fermentadas. Ortiz-Basurto et al. (2008) confirmó una correlación directa entre °Brix y el contenido de carbohidratos en aguamiel, siendo entonces °Brix una manera válida de interpretar de manera indirecta el contenido de azúcares en esta matriz; sin embargo, para las muestras fermentadas, se deben tener en consideración la interferencia que el alcohol tiene en métodos refractométricos y la probable sobre estimación que pueden provocar otros sólidos solubles en la matriz.

Para el análisis microbiológico, un mayor tiempo de fermentación se traduce inequívocamente a una reducción en el contenido de bacterias coliformes totales (no se detecta su presencia ya en el iniciador de la fermentación); el contenido de levaduras y bacterias ácido lácticas incrementa y se reduce o estabiliza en las etapas más avanzadas de la fermentación, respectivamente. Este comportamiento ha sido descrito ya previamente (Escalante et al., 2008; Valadez-Blanco et al., 2012).

Comparando el aguamiel de la región con otras (Cuadro 17), los parámetros son en su mayoría similares a los reportados en Rocha-Arriaga et al. (2020) y Ortiz-Basurto et al. (2008); para levaduras y bacterias ácido lácticas se encontró una menor

concentración con respecto a lo reportado en Álvarez-Ríos et al. (2020), de igual forma Medina-Mendoza et al. (2022) reporta una mayor acidez titulable en comparación con nuestro estudio. Para el pulque joven (Cuadro 18), únicamente pH y °Brix son similares con lo reportado en otras regiones productoras, mientras que el pulque de la región muestra menor acidez titulable y etanol y, en algunos casos, un menor contenido también de bacterias ácido lácticas (Álvarez-Ríos et al., 2022; Astudillo-Melgar et al., 2023; Chacón-Vargas et al., 2020; Escalante et al., 2008; Medina-Mendoza et al., 2022; Valadez-Blanco et al., 2012). Para el iniciador de la fermentación (Cuadro 19), los parámetros son similares a lo reportado por Álvarez-Ríos et al. (2020), excepto para la acidez titulable y viscosidad de la región michoacana analizadas en ese estudio. De igual forma, Medina-Mendoza et al. (2020) muestra valores similares con excepción de una mayor acidez titulable en la región hidalguense, comparados con los encontrados en nuestro estudio. Es importante destacar que las diferencias entre nuestra región de estudio y otras reportadas son muy probables, dadas las diferencias en especies de *Agave* empleadas y procesos de fermentación.

Cuadro 17. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre aguamiel muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado						
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ác. láctico/ 100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/ 100 mL)	Coliformes totales (log10(UFC/mL))	Bacterias ácido lácticas (log10(UFC/mL))	Levaduras (log10(UFC/mL))
Presente estudio	Querétaro	1.28-2.28	0.025-0.180	4.70-8.15	11.00-15.50	1.2-2.5	6.3-8.4	3.7-5.0
Rocha-Arriaga et al. (2020)	Hidalgo	N.A.	N.A.	3.95-6.19	8.33-13.61	N.A.	N.A.	N.A.
Ortiz-Basurto et al. (2008)	Puebla	N.A.	0.32-0.41	~ 4.5	~11.00-13.00	N.A.	N.A.	N.A.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado						
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ác. láctico/ 100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/ 100 mL)	Coliformes totales (log10(UFC/mL))	Bacterias ácido lácticas (log10(UFC/mL))	Levaduras (log10(UFC/mL))
Álvarez-Ríos et al. (2020)	Michoacán	1.14-1.3	0.05-0.53	4.58-7.32	9.57-11.7	N.A.	6.9-8.6	6.9-8.5
Medina-Mendoza et al. (2022)	Hidalgo	1.26	0.85-1.60	6.8	10	N.A.	N.A.	N.A.
Escalante et al. (2008)	Morelos	14.2	0.42	6.0	N.A.	N.A.	8.5	4.5
Valadez-Blanco et al. (2012)	Oaxaca	N.A.	0.68	4.0-5.3	4.0-5.3	N.A.	7.7-8.5	N.A.

En verde: parámetros superiores a los reportados en la región queretana. **En rojo:** parámetros inferiores a los reportados en la región queretana. **Sin color:** dentro del rango cuantificado en la región queretana. N.A.: no analizado.

Cuadro 18. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre pulque joven o listo para consumo muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado									
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	Coliformes totales (log10(UFC/mL))	Bacterias ácido lácticas (log10(UFC/mL))	Levaduras (log10(UFC/mL))	% etanol (% (v/v))	Carb. Reduct. directos (g eq. Dextrosa / 100 mL)	Ácido acético (mg/100 mL)
Presente estudio	Querétaro	1.44-2.02	0.24-0.47	3.52-4.25	4.00-9.00	0.3-1.8	5.8-9.3	5.0-7.8	1.07-2.21	0.10-2.80	0.01-0.67
Álvarez-Ríos et al. (2022)	Michoacán	1.48-1.59	0.67-0.82	3.94-4.15	7.48-8.22	N.A.	8.3-8.5	8.2-8.4	3.88-4.92	N.A.	N.A.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado									
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ácido láctico/ 100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/ 100 mL)	Coliformes totales (log10(UFC/ mL))	Bacterias ácido lácticas (log10(UFC/ mL))	Levaduras (log10(UFC/ mL))	% etanol (% (v/v))	Carbohidratos reductores directos (g eq. Dextrosa / 100 mL)	Ácido acético (mg/ 100 mL)
Astudillo-Melgar et al. (2023)	Morelos	N.A.	0.35	4.0	4.35	N.A.	N.A.	N.A.	3.70	N.A.	250.00
Chacón-Vargas et al. (2020)	Morelos	N.A.	~ 0.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	~ 5.07	N.A.	100.00
Escalante et al. (2008)	Morelos	N.A.	0.96	4.3	N.A.	N.A.	8.2	7.1	4.33	N.A.	648.84
Medina-Mendoza et al. (2022)	Hidalgo	1.30-1.34	1.25	4.01	4.3	N.A.	N.A.	N.A.	4.5	N.A.	N.A.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado									
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ácido láctico/ 100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/ 100 mL)	Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/ mL))	Bacterias ácido lácticas (log ₁₀ (UFC/ mL))	Levaduras (log ₁₀ (UFC/ mL))	% etanol (% (v/v))	Carbohidratos reductores directos (g eq. Dextrosa / 100 mL)	Ácido acético (mg/ 100 mL)
Valadez-Blanco et al. (2012)	Oaxaca	N.A.	1.32	3.70	3.00-10.00	N.A.	7.9	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

En verde: parámetros superiores a los reportados en la región queretana. **En rojo:** parámetros inferiores a los reportados en la región queretana. **Sin color:** dentro del rango cuantificado en la región queretana. N.A.: no analizado.

Cuadro 19. Comparación de los resultados promedio de diversos parámetros entre pulque semilla o iniciador de fermentación muestreado en el presente estudio y otras regiones productoras.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado							
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/mL))	Bacterias ácido lácticas (log ₁₀ (UFC/mL))	Levaduras (log ₁₀ (UFC/mL))	Carbohidratos reductores directos (g eq. Dextrosa/100 mL)
Presente estudio.	Querétaro	1.40-1.89	0.28-0.47	3.51-4.14	4.00-8.00	<0.3	5.4-7.6	5.5-7.5	<0.10-2.30
Álvarez-Ríos et al. (2020)	Michoacán.	2.48-2.92	0.77-1.02	3.69-3.87	5.47	N.A.	8.6-8.7	8.6-8.8	N.A.

Regiones productoras y estudios asociados		Parámetro analizado							
Estudio	Región productora	Viscosidad (cP)	Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	pH	°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	Coliformes totales (log10(UFC/mL))	Bacterias ácido lácticas (log10(UFC/mL))	Levaduras (log10(UFC/mL))	Carbohidratos reductores directos (g eq. Dextrosa/100 mL)
Medina-Mendoza et al. (2020)	Hidalgo	1.51	1.05-1.12	3.45-4.00	5.4-6.0	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

En verde: parámetros superiores a los reportados en la región queretana. **En rojo:** parámetros inferiores a los reportados en la región queretana. **Sin color:** dentro del rango cuantificado en la región queretana. N.A.: no analizado.

A partir de la figura 6, se comienzan a mostrar Análisis de Componentes Principales asociados a cada matriz estudiada, los cuales fueron generados a partir de las características físicas, químicas y microbiológicas expuestas en la sección 4.5. A través de los Vectores Carga (*Loading Vectors* en inglés) asociados a cada Componente Principal, es posible definir qué parámetros se asocian o son descritos por cada Componente.

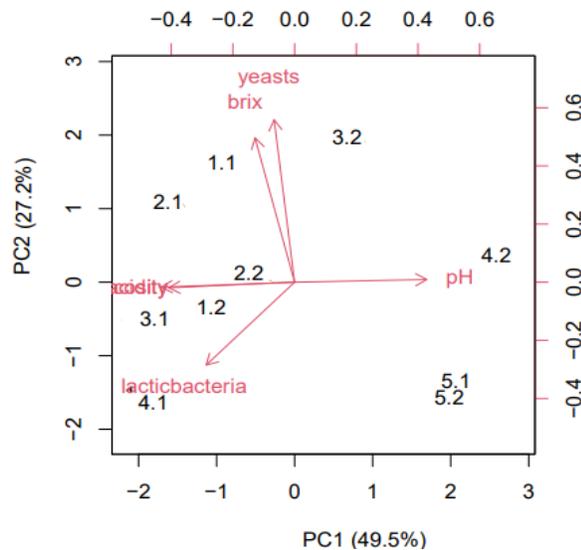


Figura 6. PCA para aguamiel (PC1=49.5% de varianza explicada y PC2=27.2% de varianza explicada). Los números representan las puntuaciones (scores) para los dos primeros Componentes Principales; las flechas rojas indican los vectores carga (Loading) de los dos primeros Componentes Principales. Para más detalles, referirse al Cuadro 11.

De esta forma, en aguamiel (Figura 6A), el Vector de Carga asociado al Primer Componente Principal se asocia primordialmente a viscosidad, acidez titulable y pH (viscosidad y acidez titulable inversamente relacionadas con pH). Con respecto al Vector de Carga asociado al Segundo Componente Principal, este se asocia primordialmente a levaduras, bacterias ácido lácticas y °Brix (levaduras y °Brix inversamente relacionadas con bacterias ácido lácticas). La interpretación de lo

previamente expuesto permite catalogar de manera general a las muestras de aguamiel de la siguiente manera: 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués) como muestras con la mayor acidez titulable y viscosidad con el menor pH, mientras que 3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 1.1 (El Lobo, El Marqués) con el mayor contenido de levaduras y °Brix y con el menor contenido de bacterias ácido lácticas.

Analizando los Vectores de Carga de la Figura 6 para aguamiel, existen algunas asociaciones de interés: existe una relación inversa entre el contenido de levaduras y bacterias ácido lácticas, lo que coincide con la desproporcionada elevada concentración de lácticas en comparación con la de levaduras en aguamiel reportada por Escalante et al. (2008) en Morelos, pero que dista de la aparente proporcionalidad que existe entre ambos grupos Álvarez-Ríos et al. (2020) en Michoacán.

Para pulque joven (Figura 7), el Vector de Carga del Primer Componente Principal se asocia primordialmente a viscosidad, carbohidratos reductores directos, °Brix y bacterias ácido lácticas (todos relacionados positivamente); mientras que el Vector de Carga del Segundo Componente Principal se asocia primordialmente a levaduras, contenido de etanol, acidez titulable, pH y contenido de ácido acético (sólo ácido acético inversamente relacionado con el resto de los parámetros). En este caso, el pH y la acidez titulable parecen relacionarse positivamente, hecho que puede explicarse desde los datos originales, pues un bajo pH no necesariamente se asocia con una mayor acidez titulable. De esta forma, las muestras 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) se podrían catalogar como las muestras con mayor viscosidad, contenido de bacterias ácido lácticas, °Brix y carbohidratos reductores directos, mientras que las muestras 1.1 (El Lobo, El Marqués), 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes), 4.1 (El Lobo, El Marqués) y 4.2 (El Lobo, El Marqués) corresponderían a muestras con el mayor contenido de etanol, acidez titulable y levaduras, así como al menor contenido de ácido acético.

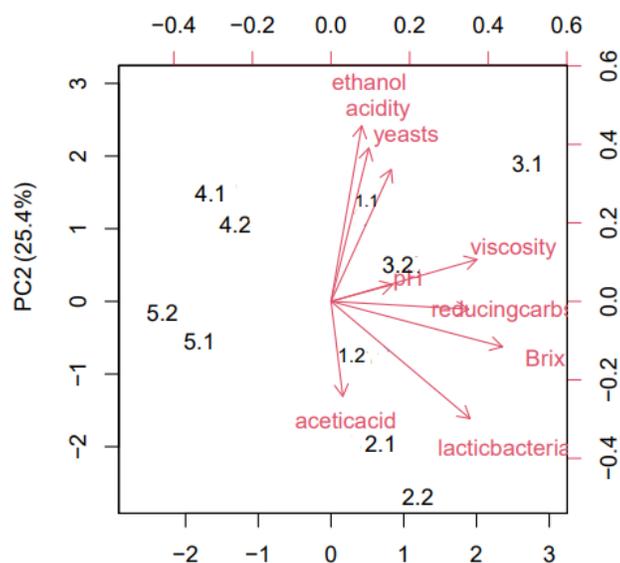


Figura 7. PCA para pulque joven (PC1=34.5% de varianza explicada y PC2=25.4% de varianza explicada). Los números en la figura representan las puntuaciones (scores) para los dos primeros Componentes Principales, mientras que las flechas rojas indican los vectores carga (Loading) de los dos primeros Componentes Principales. Para más detalles, referirse al Cuadro 11.

De igual forma, interpretando los Vectores de Carga de la Figura 7, la viscosidad se relaciona primordialmente con bacterias ácido lácticas, grupo que incluye a diversos géneros como *Leuconostoc* y *Weissella*, lo cual coincide con lo reportado en Escalante et al. (2008) para el incremento en la viscosidad en la bebida y la probable asociación con estos géneros, particularmente con *Leuconostoc*. En este sentido, una relación positiva existe entre levaduras y el contenido de etanol, lo cual coincide con la asociación positiva reportada entre levaduras y alcohol reportada en Chacón-Vargas et al. (2020) en pulque. De igual forma, una relación negativa se aprecia entre el contenido de ácido acético y la acidez titulable en la bebida, lo que coincide con lo observado en Astudillo-Melgar et al. (2023) y Chacón-Vargas et al. (2020), donde se encuentra que el ácido acético es más bien un ácido de segunda importancia en la fermentación, después del láctico.

Para el iniciador de la fermentación (Figura 8), el Vector de Carga del Primer Componente Principal se asocia primordialmente a viscosidad, °Brix y bacterias ácido lácticas (todos relacionados positivamente); mientras que el Vector de Carga del Segundo Componente se asocia primordialmente a levaduras, pH, acidez titulable y carbohidratos reductores directos (sólo carbohidratos relacionados inversamente con el resto de los parámetros). También en este caso, pH y acidez titulable parecen relacionarse de manera positiva e, igualmente, puede explicarse desde los datos originales como en el caso del pulque joven. Así, las muestras 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) se podrían asociar con el mayor contenido de °Brix, viscosidad y contenido de bacterias ácido lácticas, mientras que las muestras 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués) se asociarían con el mayor pH, acidez titulable, contenido de levaduras y el menor contenido de carbohidratos reductores directos.

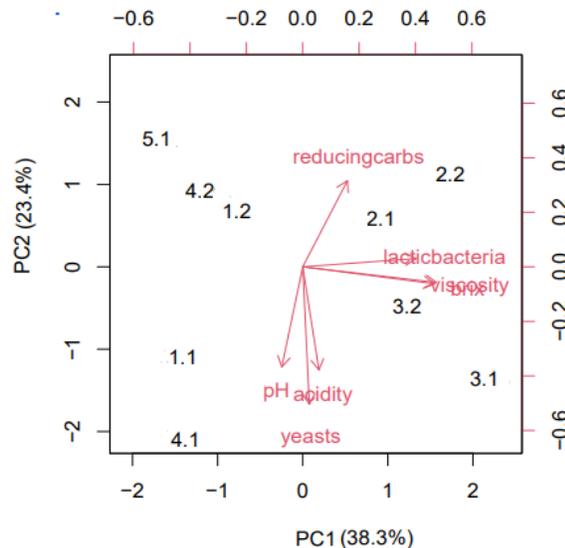


Figura 8. PCA para iniciador de la fermentación (PC1=38.3% de varianza explicada y PC2=23.4% de varianza explicada). Los números en la figura representan las puntuaciones (scores) para los dos primeros Componentes Principales, mientras que las flechas rojas indican los vectores carga (Loading) de los dos primeros Componentes Principales. Para más detalles, referirse al Cuadro 11.

Para el iniciador de la fermentación (Figura 8), la viscosidad también se relaciona positivamente con el contenido de bacterias ácido lácticas (como ocurre en pulque joven también). Igualmente, un incremento en la acidez se relaciona con un menor contenido de carbohidratos reductores directos, como se esperaba para una matriz con un periodo extendido de fermentación (Astudillo-Melgar et al., 2023).

Con la intención de resumir las tendencias en composición y características en la producción de todas las muestras, tal que sea posible comparar con mayor facilidad entre unidades de producción, se empleó el agrupamiento por K-medias, por medio de las puntuaciones (*scores*) de los dos primeros Componentes Principales.

En la Figura 9, el aguamiel muestra un agrupamiento diverso, agrupándose diferentes locaciones y *Agaves* (1.1 (El Lobo, El Marqués)-3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) en verde, 1.2 (El Lobo, El Marqués)-2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)-2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) en rojo y 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)-4.1 (El Lobo, El Marqués) en morado), mismo *Agave* y locación (1.2 (El Lobo, El Marqués)-2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)-2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) en rojo y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes)-5.2 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) en azul claro) y marcando la muestra 4.2 (El Lobo, El Marqués) por separado (azul oscuro). En la Figura 10, el pulque joven se agrupa por región y *Agave* empleado sin importar el tiempo de fermentación (4.1-4.2 (correspondiendo ambas estaciones a El Lobo, El Marqués) en azul claro, 5.1-5.2 (correspondiendo ambas estaciones a Charco Frío, Cadereyta de Montes) en verde, 2.1-2.2 (correspondiendo ambas estaciones a Boyé, Cadereyta de Montes) en morado y 1.1-1.2 (las primeras dos asociadas a El lobo, El Marqués)-3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) en azul oscuro), marcado sólo de manera separada a la muestra 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) en rojo. Finalmente, en la Figura 11 el iniciador de la fermentación muestra cierto patrón, agrupándose por región y *Agave* empleado (2.1-2.2 (ambas asociadas a Boyé, Cadereyta de Montes) en azul claro y 3.1-3.2 (ambas asociadas a Boyé, Cadereyta de Montes) en azul oscuro), por región sin importar el *Agave* empleado

(1.1(El Lobo, El Marqués)-4.1 (El Lobo, El Marqués) en verde y 1.2 (El Lobo, El Marqués)-4.2 (El Lobo, El Marqués) en rojo); por último, se agrupa a 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) con el mismo *Agave* empleado, aunque en otra región diferente (5.1-4.2 (El Lobo, El Marqués)-1.2 (El Lobo, El Marqués) en rojo).

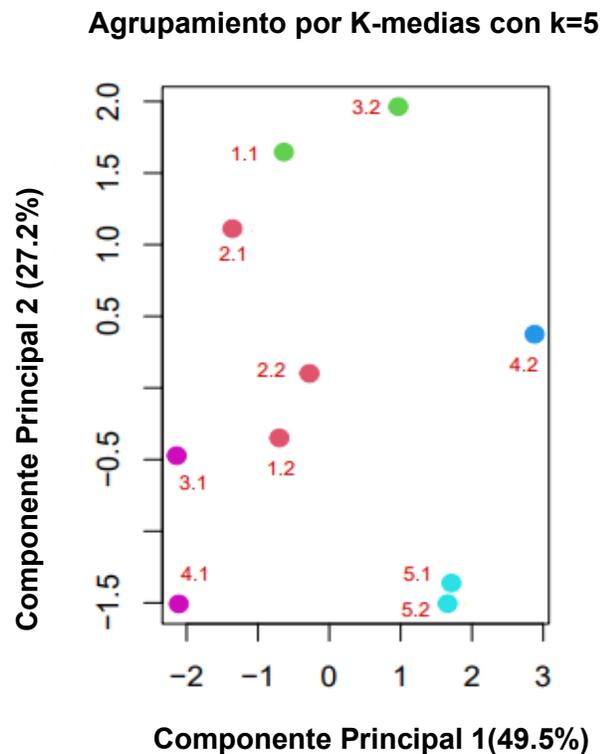


Figura 9. PCA y agrupamiento por K-medias para aguamiel (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS, en inglés) con 5 centroides=3.60) empleando las Puntuaciones del PCA previo. Puntos de mismo color fueron asignados por el algoritmo al mismo clúster. Para detalles, referirse al Cuadro 11.

En la Figura 9, el aguamiel muestra un agrupamiento diverso, agrupando sólo en dos ocasiones muestras por misma especie de *Agave* y región de estudio. Esto resalta la probable influencia que el ambiente inmediato a la planta abierta y las prácticas agrícolas pueden tener sobre las características del aguamiel y la

relevancia de la especie de *Agave* que se emplea, explicando así la variabilidad en la matriz.

Nuestros resultados son similares a la variabilidad encontrada en el aguamiel muestreado en dos diferentes localidades y de dos especies de *Agave* en una fecha de muestreo realizado en Michoacán por Álvarez-Ríos et al. (2020); al muestreo de aguamiel (aunque de especie desconocida de *Agave*) en un periodo de 5 semanas en una estación productora en Oaxaca, México (Valadez-Blanco et al., 2012); y al muestreo de aguamiel de *A. salmiana* en tres diferentes localidades de Hidalgo, México en Rocha-Arriaga, et al. (2020). Nuestros resultados contrastan con la imagen homogénea encontrada en la matriz en una sola estación productora a partir de una misma planta de *A. mapisaga*, estudiada a lo largo del periodo productivo de la planta en Ortiz-Basurto et al. (2008).

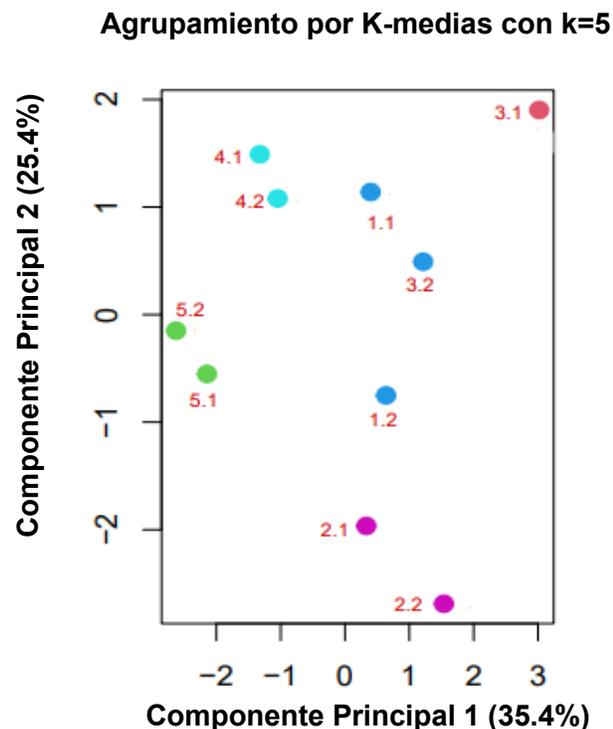


Figura 10. PCA y agrupamiento por K-medias para pulque joven (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS) con 5 centroides= 3.51) empleando las Puntuaciones del PCA previo. Puntos de mismo color fueron asignados por el algoritmo al mismo clúster. Para detalles, referirse al Cuadro 11.

Para las matrices fermentadas, se encuentran asociaciones hasta cierto punto esperadas o lógicas (por región, *Agave*, etc.) en comparación con las halladas en aguamiel, lo que podría asociarse a que, producto de la fermentación, los grupos de microorganismos más capaces de desarrollarse y de tolerar los compuestos antimicrobianos que se van sintetizando, produce cierta homogeneidad en las matrices fermentadas. En la Figura 10, el pulque joven se agrupa principalmente por región, proceso de elaboración y *Agave* empleado, sin importar el tiempo de fermentación ni la fecha de muestreo. Únicamente la muestra 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) se marca como única, probablemente debido a su elevada viscosidad y acidez. Las asociaciones previas son similares a lo reportado en Michoacán por Álvarez-Ríos et al. (2020), donde no se encuentra diferencia significativa entre pulques elaborados en dos regiones diferentes, diferente tiempo y proceso de fermentación; además, es también similar a lo reportado Rocha-Arriaga et al. (2020) para pulque joven producido en tres diferentes localidades en Hidalgo, México.

Agrupamiento por K-Medias con k=4

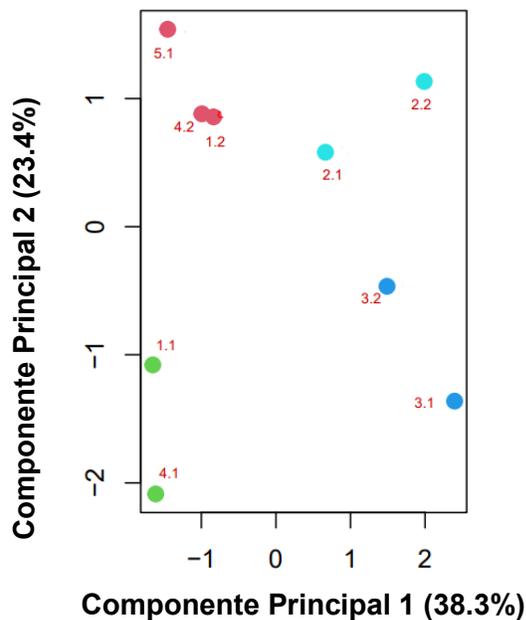


Figura 11. PCA y agrupamiento por K-medias para el iniciador de fermentación (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS) con 4 centroides=2.86) empleando las Puntuaciones del PCA previo. Puntos de mismo color fueron asignados por el algoritmo al mismo clúster. Para detalles, referirse al Cuadro 11.

Finalmente, en la Figura 11, el iniciador de la fermentación se agrupa principalmente por estación, proceso de fermentación y *Agave* empleado, pero también exclusivamente por región o por región y *Agave* empleado (como en el grupo 1.2 (El Lobo, El Marqués)-4.2 (El Lobo, El Marqués)-5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) marcado en rojo). Este comportamiento relativamente homogéneo coincide con lo observado por Álvarez-Ríos et al. (2020), donde los iniciadores de la fermentación analizados muestran similitudes incluso entre dos estaciones productoras diferentes y dos especies diferentes de *Agave* empleadas en su elaboración.

Aunque los resultados muestran cierta homogeneidad dentro de la región productora estudiada, es evidente sobre todo en las matrices fermentadas que la etapa de fermentación, la especie de *Agave* empleada y la localidad tienen la mayor influencia en las características de la bebida. Atención principalmente a las condiciones de fermentación, podría suponer una herramienta útil para favorecer una calidad homogénea en la bebida, aún desde su producción artesanal. Además, los presentes resultados permiten expandir el conocimiento de la bebida y su comportamiento dentro de una región productora con múltiples estaciones de producción, distintas especies de *Agave* empleadas y procesos de elaboración también con particularidades, siempre considerando la perspectiva artesanal de la elaboración de la bebida.

5.3 Perfil de volátiles

El aroma asociado a diferentes productos alimenticios está fuertemente determinado por moléculas orgánicas volátiles, las cuales pueden provenir de la maduración de plantas, fermentaciones, entre otros. El estudio de estas moléculas resulta relevante sobre todo en el pulque joven, ya que será la bebida consumida

en realidad, siendo esta la razón por la que sólo se analizan los compuestos volátiles en esta matriz (Starowicz, 2021).

Originalmente, 111 compuestos fueron tentativamente identificados con una identidad superior al 70% con respecto a la base de datos NIST. Dada la complejidad del análisis, todos los compuestos con un valor menor a las 100,000,000 Unidades Arbitrarias (*Arbitrary Units*, en inglés) fueron descartados. De esta forma, se conservaron únicamente 53 compuestos. A partir de estos compuestos, se creó un mapa de calor (Figura 12), un PCA y un agrupamiento por K-medias (Figura 13A y 13B), empleando el *pipeline* previamente descrito (James et al., 2023). Una de las tres submuestras del muestreo 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) se perdió digitalmente, por eso sólo fue posible analizar dos submuestras en este muestreo.

El PCA presentado en la Figura 13A y 13B presenta 53 de los 111 compuestos originalmente detectados y el PCA representó el 45.5% de la variabilidad original, lo que se puede explicar o entender desde dos perspectivas: primero, dada la elevada cantidad de compuestos detectados y segundo y tal vez más importante, es el origen artesanal de la bebida con su inherente heterogeneidad. Es importante reconocer que la aplicación del umbral previamente mencionado conlleva inevitablemente a la pérdida de algunos componentes minoritarios. Con respecto a la detección de ftalatos, se reconocen como un grupo de moléculas ampliamente distribuidas en el ambiente, con un efecto como químicos disruptores endócrinos para humanos y metabólicos en otros organismos. Su amplia presencia se asocia típicamente a la producción de plásticos, de ahí su ubiquidad (aunque algunos se han reportado como naturalmente presentes) (Martínez-Ibarra, et al., 2021; Huang, et al., 2021). Su presencia a lo largo de la región muestreada puede atribuirse al uso extendido de contenedores y herramientas de plástico en todas las estaciones productoras.

En la Figura 12, se muestra el mapa de calor de Unidades Arbitrarias Escaladas en el que, de los 53 compuestos principales encontrados, ésteres, ácidos, alcoholes y otros compuestos fueron identificados en orden descendente con base en su abundancia. Es importante mencionar que el etanol y diversos componentes asociados a ftalatos fueron detectados a lo largo de la región de muestreo, pero no se consideraron dentro de esta sección. Dentro de los diversos compuestos detectados, 13 fueron identificados en todas las muestras sin importar la región de producción, Agave empleado y el proceso y tiempo de fermentación: etil acetato ; 3-metil-1-butanol; ácido hexanoico, etil éster; 2-etilhexil (2S)-2-hidroxiopropanoato; ácido acético; ácido octanoico, etil éster; etil 9-decenoato; ácido acético, 2-feniletil éster; ácido dodecanoico, etil éster; feniletil alcohol; ácido octanoico; ácido decanoico y etil 9- hexadecenoato.

La detección de estos 13 compuestos en común entre todas las muestras de pulque joven (sin importar *Agave*, proceso de fermentación y estación productora) puede ser nombrada como un “núcleo de aroma” asociado a la bebida. De estos 13 compuestos, el etil 9-decenoato y etil 9-hexadecenoato no han sido previamente reportados en pulque. En cuanto a los restantes 40 compuestos detectados fuera del núcleo de aroma, únicamente 7 han sido previamente reportados en la bebida: 2-metil-1-propanol; 3-metil-1-butanol, acetato; D-Limoneno; ácido nonanoico, etil éster; ácido decanoico, metil éster; ácido decanoico, etil éster y el ácido bencenopropanoico, etil éster (De León et al., 2007).

A través de los Vectores de Carga (*Loading vectors*) de los Componentes Principales es posible definir qué parámetros se asocian a cada Componente. En este caso, en la Figura 13 A, el Vector de Carga del Primer Componente Principal se asocia principalmente con 2-metil-1-propanol; 3-metil-1-butanol; ácido octanoico, etil éster; isopentil hexanoato; ácido octanoico, isobutil éster; etil tridecanoato; ácido octanoico, 3-metilbutil éster; ácido decanoico, 2 metilpropil éster; feniletil alcohol; ácido octanoico; ácido hexadecanoico, etil éster; (E)-11 ácido hexadecenoico, etil

éster; ácido decanoico; ácido octanoico, 2-feniletil éster y 2-hidroxiciclopentadecan-1-ona (todos relacionados positivamente, excepto el etil tridecanoato). Con respecto al Vector de Carga del Segundo Componente, este se asocia principalmente a (Z,Z)-9,12 ácido octadecadienoico; etil 9-hexadecenoato; ácido heptadecanoico, etil éster; (E)-9 ácido octadecenoico, etil éster; ácido pentadecanoico, etil éster; ácido

Compuestos volátiles identificados en pulque joven de tres diferentes regiones productoras de pulque del estado de Querétaro

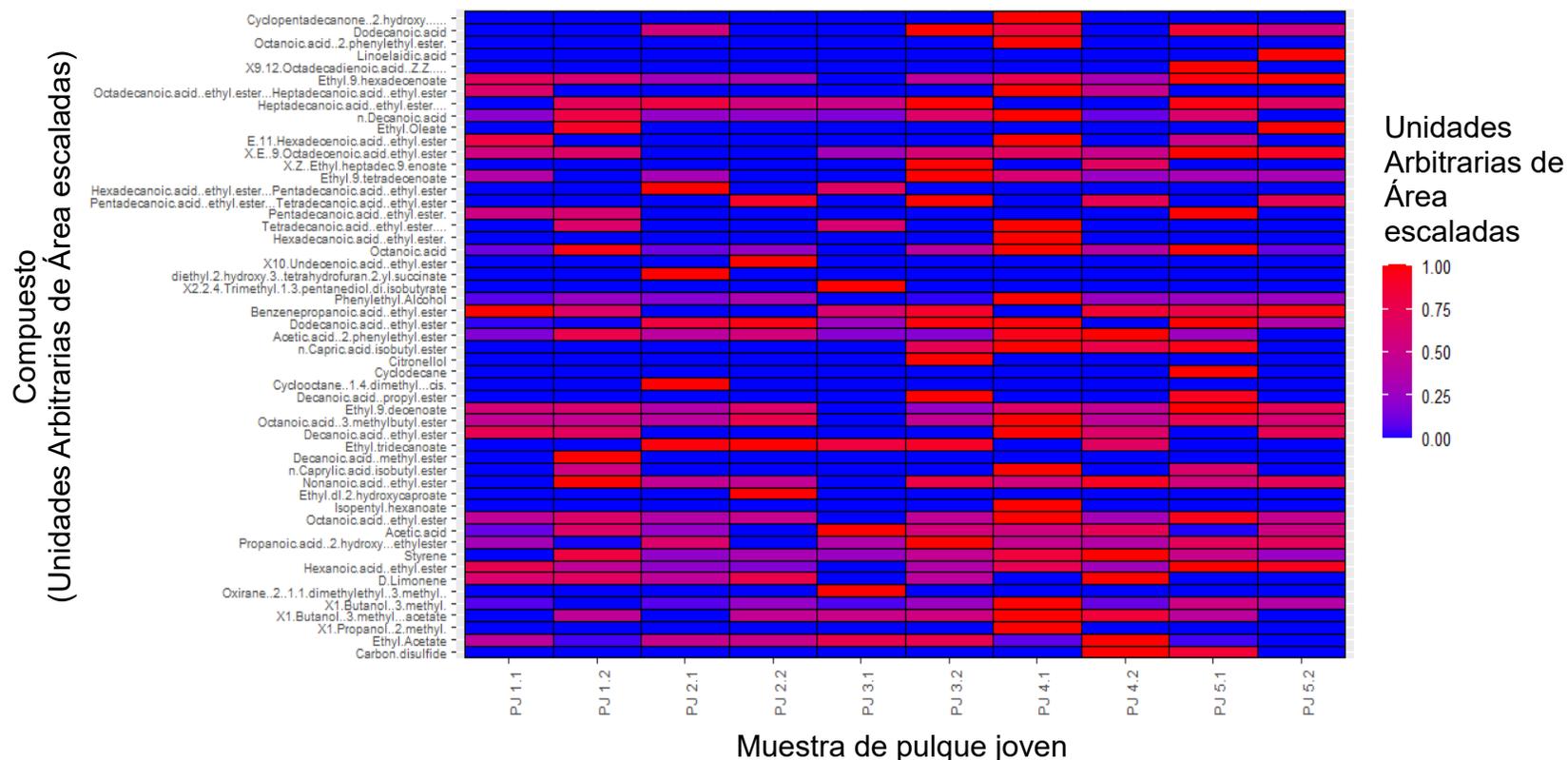
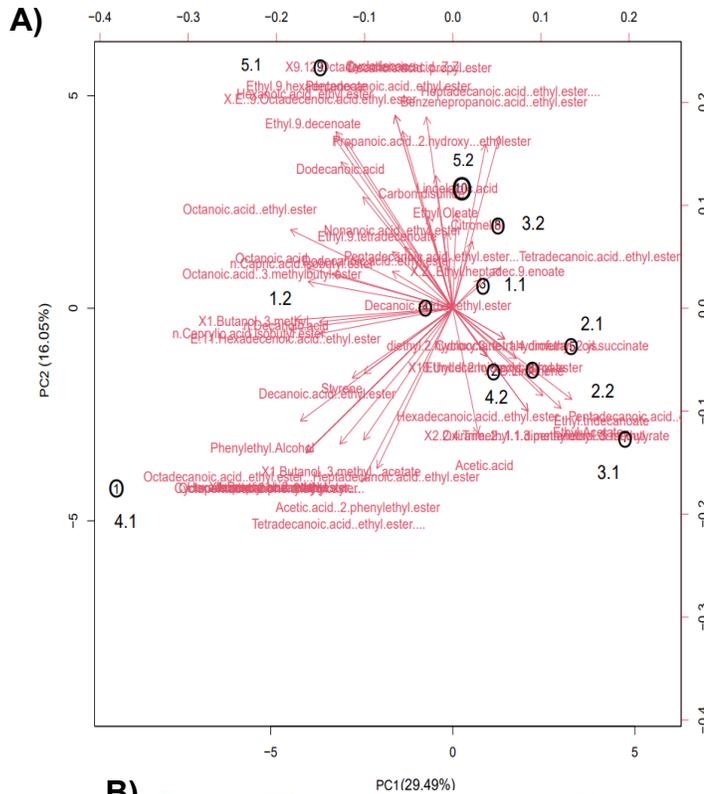


Figura 12. Mapa de calor para los compuestos volátiles del pulque joven. Se presentan Unidades Arbitrarias Escaladas (desde 0 a 1). “PJ” hace referencia a “pulque joven” y el número inmediato posterior hace referencia a la estación de muestreo (referirse a Cuadro 11 para detalles).

tetradecanoico, etil éster; ácido bencenopropanoico, etil éster; ácido acético, 2-feniletil éster; ciclodecano; ácido decanoico, propil éster; etil 9-decenoato y ácido hexanoico, etil éster (ácido tetradecanoico, etil éster y ácido acético, 2-feniléster inversamente relacionados con el resto de los compuestos).

En las Figuras 13A y 13B, los Vectores Carga de los Componentes Principales suponen una herramienta útil para dilucidar el aroma del pulque joven analizando su valores (en este caso, se consideran únicamente aquellos compuestos con un valor arbitrario igual o superior a 0.17 (valor absoluto) en ambos Componentes Principales), permitiendo asociar notas específicas a cada muestra. Es importante tomar en cuenta, sin embargo, que el presente análisis no considera la concentración de cada compuesto y, dado el umbral de detección asociado a cada compuesto, puede que la nota asociada a cada uno no sea detectable en el producto.

Para el Primer Componente (PC1), 2-metil-1-propanol se asocia a notas a manzana, cacao y vino (Flavor & Extract Manufacturers Association, 2024 a); 3-metil-1-butanol para notas quemadas, cacao, florales y de malta (FEMA, 2024 b); ácido octanoico, etil éster para notas a durazno, brandy, florales, piña y grasas u oleosas (FEMA, 2024 c); hexanoato de isopentio para notas de anís, frutales y especiadas (FEMA, 2024 d); ácido octanoico, isobutil éster para notas florales, verdes y oleosas (Sun et al., 2012); etil tridecanoato para notas a manzana horneada (Weiss et al., 2023); ácido octanoico, 3-metilbutil éster para notas frutales (Massenet et al., 2020); ácido decanoico, 2-metilpropil éster para notas fermentadas, brandy o cognac (Chemical Book, 2023); feniletil alcohol para notas frutales, miel, rosas y vino (FEMA, 2024 e); ácido octanoico para notas a queso, grasas y verdes o vegetales (FEMA, 2024 f); ácido hexadecanoico, etil éster para notas cerosas (FEMA. 2024 g); (E)-11 ácido hexadecenoico, etil éster para notas grasas (Zhao et al., 2024); ácido decanoico para notas terrosas, vegetales o verdes y oleosas (FEMA, 2024 h); ácido octanoico, 2-fenilestil éster para notas frutales (FEMA, 2024 i); y 2-hidroxi-



B) Agrupamiento por K-Medias con k=6

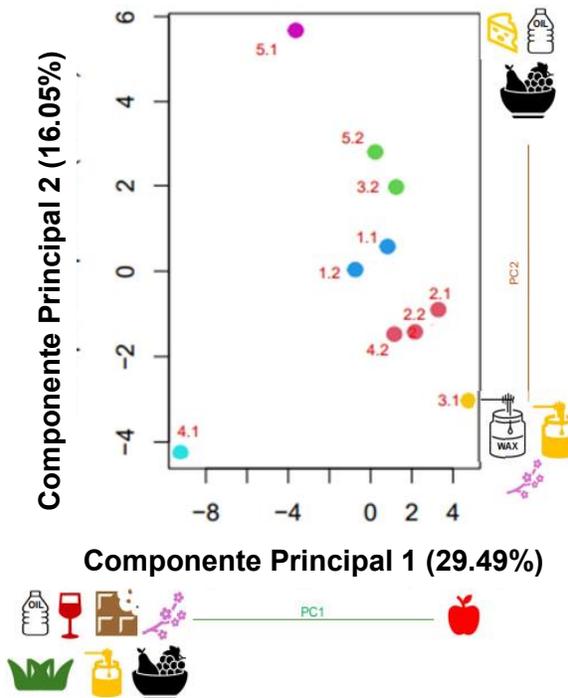


Figura 13. A) PCA para los volátiles detectados en pulque joven (PC1=29.49% de varianza explicada y PC2=16.05% de varianza explicada). Los números en la figura representan las puntuaciones (scores) de los dos primeros Componentes Principales y las flechas rojas indican los dos primeros Vectores de Carga. **B)** Agrupamiento por K-medias para los volátiles de pulque joven (Suma de Cuadrados Intra Clúster (WCSS) con 6 centroides=4.74), empleando las puntuaciones generadas en el PCA previo. Puntos de mismo color implica una asociación al mismo clúster por parte del algoritmo. Para más detalles, referirse al Cuadro 11.

ciclopentadecano-1-ona sin una asociación clara con ninguna nota específica pero asociado a plantas (Pubchem, 2024 a) (todos relacionados positivamente, excepto por el etil tridecanoato).

Con respecto al Segundo Componente Principal (PC2), este se asocia principalmente con (Z,Z)-9,12 ácido octadadienoico para notas lácteas (FEMA, 2024 j); etil 9-hexadecenoato para notas oleosas (Zhao et al., 2024); ácido heptadecanoico, etil éster para notas terregosas (Zhao et al., 2024); (E)-9 ácido octadecenoico, etil éster sin asociación con ninguna nota específica; ácido pentadecanoico, etil éster para notas cremosas (Zhao et al., 2024); ácido tetradecanoico, etil éster para notas cerosas (FEMA, 2024 k); ácido bencenopropanoico, etil éster para notas florales y de miel (FEMA, 2024 l); ácido acético, 2-feniletil éster para notas florales, miel y rosas (FEMA, 2024 m); ciclodecano sin ningún aroma asociado, pero encontrado en matrices vegetales (Kosma et al., 2020); ácido decanoico, propil éster para notas verdes o vegetales, maderosas y oleosas (Pubchem, 2024 b; Perflavory, 2021); etil 9-decenoato para notas frutales (Morata et al., 2022); y ácido hexanoico, etil éster para notas a cáscara de manzana, brandy, goma sabor fruta, uva sobre madurada y piña (FEMA, 2024 n) (ácido tetradecanoico, etil éster y ácido acético, 2-fenilester inversamente relacionados con el resto de los compuestos).

De esta forma, las muestras pueden dividirse en general en cuatro categorías: notas florales, miel, oleosas o cerosas, verdes o vegetales y frutales para la muestra 4.1 (El Lobo, El Marqués); notas florales, lácteas, oleosas o cerosas, miel, verdes o vegetales y frutales para 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes); notas a manzana horneada, cerosas y miel para las muestras 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes), 4.2 (El Lobo, El Marqués), 2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes); y notas a manzana horneada, frutales, oleosas y lácteas para 1.1 (El Lobo, El Marqués), 1.2 (El Lobo, El Marqués), 5.2 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) y 3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes).

La mayoría de los compuestos identificados en el aroma del pulque se pueden clasificar como ésteres, ácidos o alcoholes superiores, todos relacionados con el metabolismo de levaduras (Wang et al., 2023). Esta pieza de información, en conjunto con la presencia de levaduras (particularmente *S. cerevisiae* que se discute en la sección de clasificación taxonómica) en frecuencias relativas superiores a 93.70% en el pulque joven, señalan a las levaduras como un importante participante en la consolidación del aroma del pulque joven de la región.

Empleando las puntuaciones (*scores*) de los primeros Componentes Principales, es posible agrupar a las diferentes muestras por medio del algoritmo K-medias. En la Figura 13B, los volátiles del pulque joven permiten agrupar a las muestras por región y *Agave* empleado (1.1-1.2 (ambas asociadas a El Lobo, El Marqués) en azul oscuro y 2.1-2.2 (estas dos asociadas a Boyé, Cadereyta de Montes)-4.2 (El Lobo, El Marqués) en rojo), pero también por *Agave* y región (2.1-2.2 (estas dos asociadas a Boyé, Cadereyta de Montes)-4.2 (El Lobo, El Marqués) en rojo y 3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes)-5.2 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) en verde), marcando finalmente como únicos a 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) (amarillo), 4.1 (El Lobo, El Marqués) (azul claro) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) (morado).

En la Figura 13B, el agrupamiento de las muestras de pulque joven con base en los volátiles detectados difiere tanto en asociación como en número de clústers identificados con respecto a lo observado en la Figura 10, señalando la probable evolución independiente del aroma de la bebida con respecto a las características físicas, químicas y microbiológicas de la bebida. Mientras que algunas asociaciones se conservan entre ambas Figuras o análisis como 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes), 1.1-1.2 (ambas asociadas a El Lobo, El Marqués) y 2.1-2.2 (Boyé, Cadereyta de Montes), el resto cambia por completo. El agrupamiento basado en el perfil de volátiles del pulque joven se da principalmente por región y *Agave* empleado, sin importar el proceso de fermentación.

De manera similar a lo observado en la Figura 10, se apunta principalmente a la estación productora y a la especie de *Agave* como los principales factores que influyen en el aroma de la bebida. Interesantemente, el agrupamiento de algunas muestras se da de manera no prevista, como en 3.2 (Boyé, Cadereyta de Montes)-5.2 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) ambas con tiempos de fermentación y características de elaboración radicalmente diferentes.

5.4 Asignación taxonómica

La diversidad microbiana del pulque ha sido estudiada ya previamente desde la perspectiva metagenómica (Astudillo-Melgar et al., 2020; Chacón-Vargas et al., 2020; Rocha-Arriaga et al., 2020), pero limitando el estudio a una estación productora y a unas cuantas fechas de muestreo. De acuerdo con nuestro conocimiento, nuestro estudio es el primero en estudiar diferentes estaciones productoras a lo largo de una región productora y una temporada de producción (verano). Es importante mencionar de nuevo que el presente estudio trata de presentar un acercamiento integral para entender la bebida: desde una perspectiva química, física y microbiológica hasta metagenómica.

Con respecto a las bacterias (Figura 14), en aguamiel se detectaron 11 diferentes grupos microbianos (9 géneros, una familia y un conglomerado de géneros) en todas las muestras recolectadas en la región: *Periweissella*, *Leuconostoc*, lactobacilli (empleando la nomenclatura actualizada sugerida por Zheng et al., 2020 para hacer referencia a distintos géneros nuevos previamente asociados al antiguo género *Lactobacillus*), *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus*, *Hafnia* y la familia Moraxellaceae. En pulque joven, un total de 9 grupos (7 géneros, una familia y un conglomerado de géneros) se comparten entre todas las muestras recolectadas en la región: *Acetobacter*, lactobacilli, *Leuconostoc*, *Periweissella*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus* y la familia Moraxellaceae. Finalmente, para el iniciador de

fermentación 10 grupos (8 géneros, una familia y un conglomerado de géneros) están presentes en todas las muestras recolectadas: *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, lactobacilli, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus*, *Hafnia* y la familia Enterobacteriaceae.

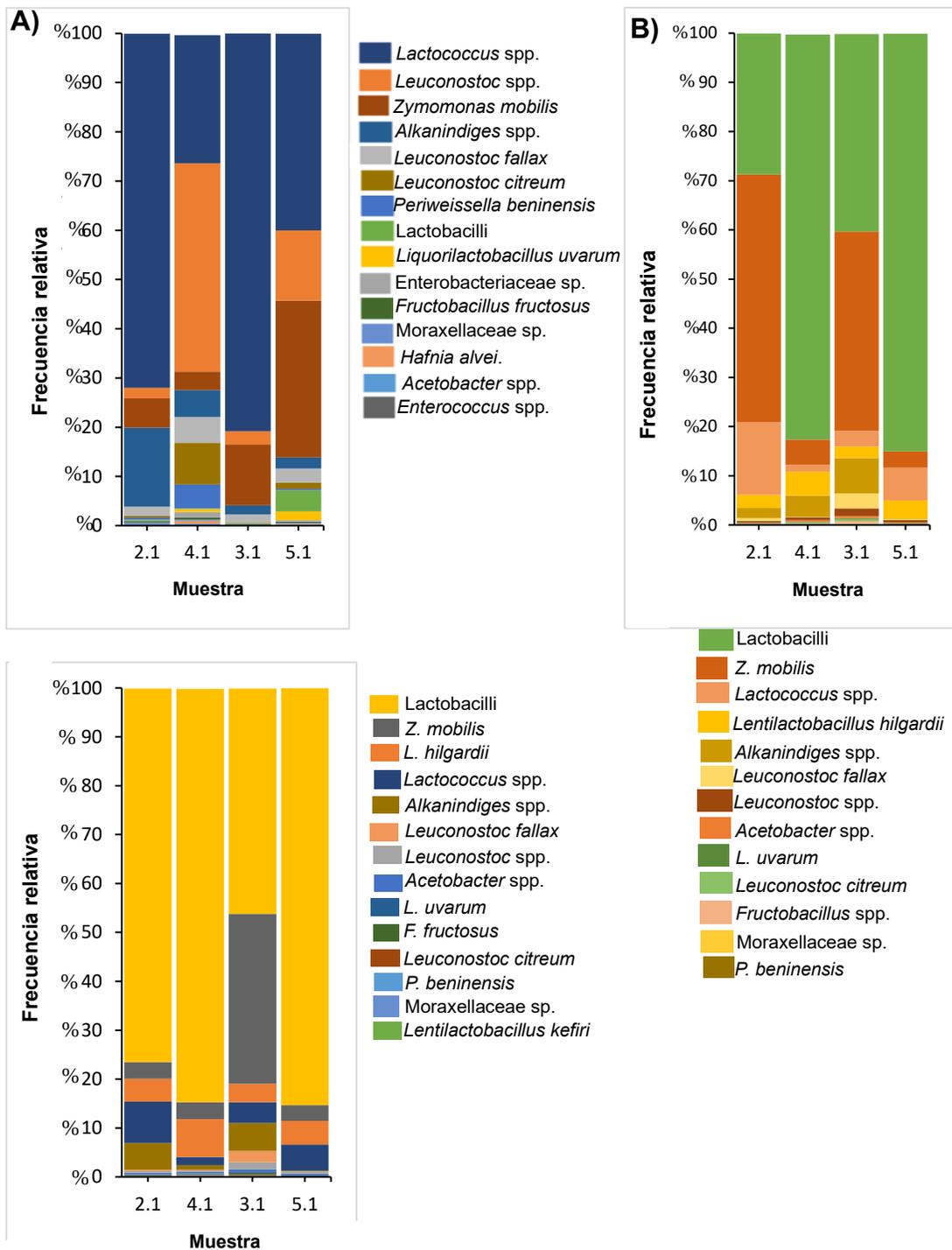


Figura 14. Asignación taxonómica bacteriana de las diferentes matrices muestreadas. Empleando base de datos SILVA 132: **A)** Frecuencia relativa (F.R.) para bacterias en aguamiel. **B)** F.R. para bacterias en pulque joven. **C)** F.R. para bacterias en iniciador de fermentación. Sólo microorganismos con F.R. $\geq 0.10\%$ por fines de visualización.

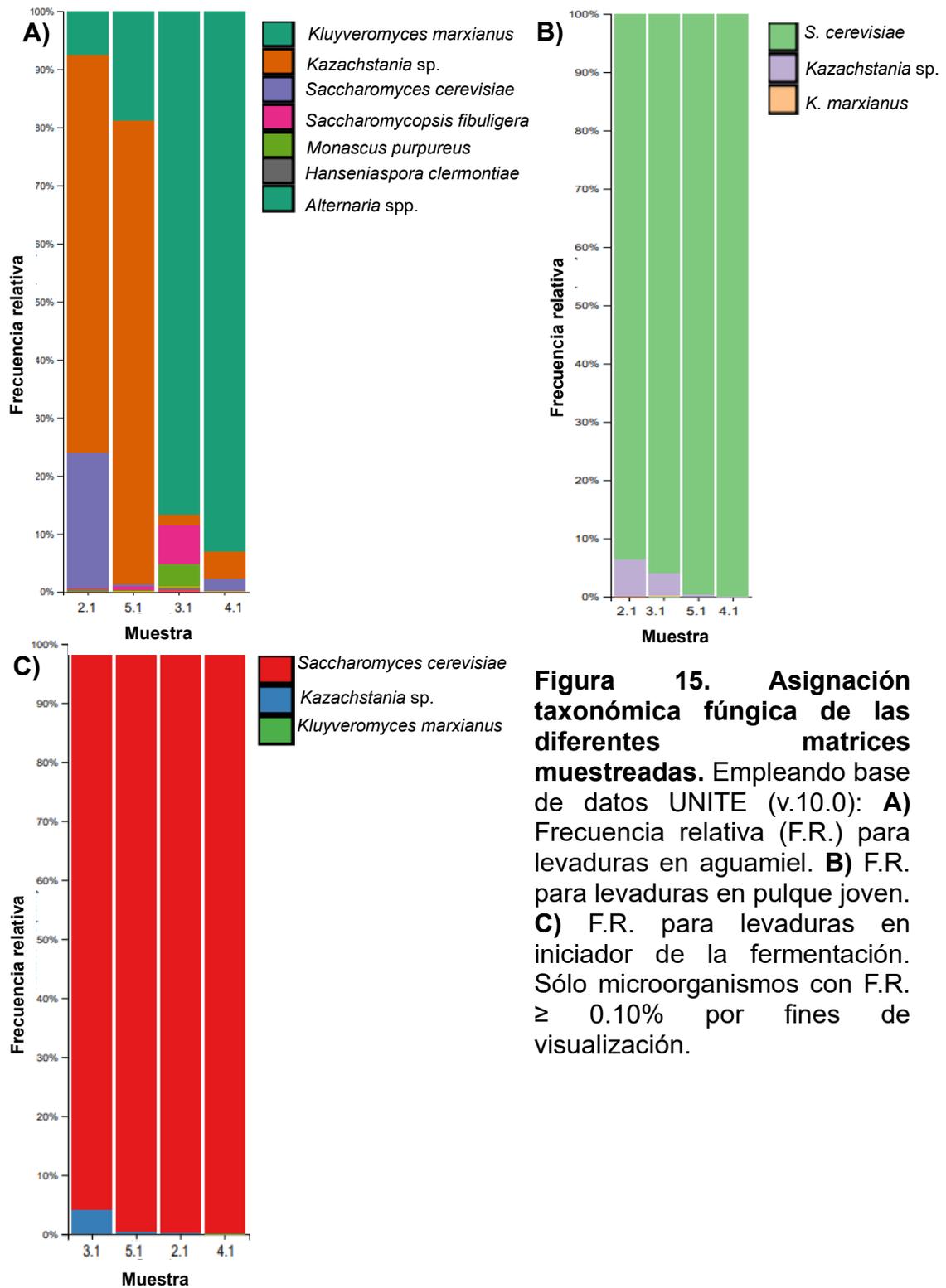


Figura 15. Asignación taxonómica fúngica de las diferentes matrices muestreadas. Empleando base de datos UNITE (v.10.0): **A)** Frecuencia relativa (F.R.) para levaduras en aguamiel. **B)** F.R. para levaduras en pulque joven. **C)** F.R. para levaduras en iniciador de la fermentación. Sólo microorganismos con F.R. $\geq 0.10\%$ por fines de visualización.

En el caso de hongos (Figura 15), en aguamiel únicamente tres grupos se encuentran presentes en todas las muestras de la región (3 géneros): *Saccharomcyes*, *Kluyveromyces* y *Kazachstania*. En el caso de las matrices fermentadas (pulque joven e iniciador de la fermentación), sólo un género se encuentra presente en todas las muestras de la región: *Saccharomyces*.

Tanto para bacterias como para hongos, las lecturas asociadas a cada taxón se encuentran disponibles en el BioProject por publicarse mencionado en la sección 4.

Como se discute anteriormente, es posible proponer tanto un “núcleo microbiano regional” y un “núcleo regional microbiano por muestra”, conteniendo tanto levaduras como bacterias. Esto se traduciría en el caso del primer núcleo propuesto en la definición de un pequeño número de grupos microbianos presentes en todas las etapas del proceso de elaboración de pulque (desde aguamiel hasta el iniciador de la fermentación) a través de toda la región productora; mientras que para el segundo núcleo implicaría identificar grupos microbianos presentes en una matriz específica en todas las muestras recolectadas.

En este sentido, el núcleo regional para aguamiel estaría conformado por 14 grupos: *Periweissella*, *Leuconostoc*, lactobacilli, *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus*, *Hafnia*, *Saccharomcyes*, *Kluyveromyces*, *Kazachstania* y la familia Moraxellaceae. Este núcleo representaría más del 98.15% y 88.15% de la frecuencia relativa total bacteriana y fúngica, respectivamente. Igualmente, el núcleo regional para pulque joven se conformaría por 10 grupos: *Acetobacter*, lactobacilli, *Leuconostoc*, *Periweissella*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus*, *Saccharomyces* y la familia Moraxellaceae. El núcleo representaría más de 99.65% y 93.70% de la frecuencia relativa total bacteriana y fúngica, respectivamente. Por último, el núcleo regional para el iniciador de la fermentación comprendería 11 grupos: *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, lactobacilli, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Zymomonas*,

Alkanindiges, *Fructobacillus*, *Hafnia*, *Saccharomyces* y la familia Enterobacteriaceae. Este núcleo representaría más de 99.57% y 95.91% de la frecuencia relativa total bacteriana y fúngica, respectivamente.

Para toda la región muestreada, 8 grupos de microorganismos están presentes en todas las etapas de producción (desde aguamiel, pasando por pulque joven hasta el iniciador de la fermentación): *Saccharomyces*, *Leuconostoc*, lactobacilli, *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges* y *Fructobacillus*. Todos los grupos en común previamente presentados muestran un valor igual o superior a 0.01% de frecuencia relativa.

Entonces, el núcleo microbiano regional (todas las matrices y localidades) constaría de 8 grupos: *Saccharomyces*, *Leuconostoc*, lactobacilli, *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges* and *Fructobacillus* genera.

Analizando a detalle los grupos bacterianos en común para aguamiel, los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* dominan en prácticamente todas las muestras (26.0%-80.8% frecuencia relativa y 4.3%-56.0% frecuencia relativa, respectivamente), seguidos por *Zymomonas* (5.9%-31.9%), *Alkanindiges* (1.9%-16.1%), *Periweissella* (0.3%-4.9%), lactobacilli (0.1%-6.1%), *Fructobacillus* (0.2%-0.4%), Moraxellaceae sp. (0.1%-0.6%), *Hafnia* (0.0%-0.6%), *Acetobacter* (0.0%-0.2%) y *Komagataeibacter* (0.01%).

En el caso de pulque joven, el conglomerado bacteriano es principalmente dominado por lactobacilli (31.6%-88.9%), seguido por *Zymomonas* (3.3%-50.4%), *Lactococcus* (1.4%-14.7%), *Alkanindiges* (0.1%-7.1%), *Leuconostoc* (0.6%-5.0%), *Acetobacter* (0.1%-0.4%), *Fructobacillus* (0.0%-0.5%), Moraxellaceae sp. (0.0%-0.2%) y *Periweissella* (0.0%-0.1%).

Finalmente, en el conglomerado asociado al iniciador de la fermentación predomina de igual manera lactobacilli (49.9%-92.7%), *Zymomonas* (3.2%-34.8%), *Lactococcus* (1.7%-8.5%), *Alkanindiges* (0.9%-5.7%), *Leuconostoc* (0.5%-3.9%), *Acetobacter* (0.3%-0.6%), *Fructobacillus* (0.0%-0.4%), *Hafnia* (0.0%-0.03%), *Komagataeibacter* (0.0%-0.02%) y Enterobacteriaceae sp. (0.0%-0.02%).

De manera más concisa para los grupos fúngicos encontrados, en aguamiel predomina *Kluyveromyces* (7.5%-93.0% frecuencia relativa), seguida por *Kazachstania* (1.8%-79.8%) y *Saccharomyces* (0.0%-23.4%). En pulque joven y el iniciador de la fermentación, existe un dominio evidente por parte de *Saccharomyces* (93.7%-100% and 95.9%-100%, respectivamente).

Los grupos microbianos propuestos como integrantes de los distintos núcleos muestran dinámicas diferentes en cada muestra y conforme las etapas del proceso avanzan hacia mayor tiempo de fermentación. Para bacterias, en aguamiel dominan de manera evidente los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc*, tendencia que se conserva sólo parcialmente en muestras más fermentadas. El género *Zymomonas* (tercero en frecuencia relativa desde aguamiel) se convierte en el segundo grupo dominante en las muestras fermentadas, seguido precisamente en estas matrices por los géneros dominantes en el aguamiel (*Lactococcus* y *Leuconostoc*). Interesantemente, el grupo lactobacilli apenas presente en el aguamiel, termina por dominar en las matrices más fermentadas (pulque joven e iniciador de la fermentación). La familia Moraxellaceae y los géneros *Alkanindiges* y *Periweissella* muestran una tendencia a la baja en las muestras más fermentadas, con respecto a su presencia en aguamiel. El género *Fructobacillus* se mantiene prácticamente estable a lo largo de todo el proceso, mientras que el género *Hafnia*, presente en aguamiel, reaparece en baja proporción en el iniciador de la fermentación, patrón compartido con el género *Komagataeibacter*. Por otra parte, el género *Acetobacter* incrementa su presencia en las matrices más fermentadas. Para la familia Enterobacteriaceae, únicamente está presente en todas las muestras de iniciador

de fermentación y ningún patógeno fue detectado dentro de este grupo. Con respecto a la dinámica fúngica, mientras que los géneros *Kazachstania* y *Kluyveromyces* dominan sobre *Saccharomyces* en aguamiel, esta tendencia es completamente revertida en todas las muestras fermentadas, donde *Saccharomyces* domina por completo sobre los otros dos géneros.

En cuanto a la probable función que desempeña cada microorganismo propuesto en los diferentes núcleos, *Lactococcus* contribuye en la parcial acidificación del aguamiel hasta las condiciones ácidas detectadas en las matrices fermentadas; asimismo, algunas cepas pueden tener un impacto en el sabor del pulque mediante el metabolismo del citrato (Holzapfel & Wood, 2014). *Leuconostoc*, como hetero fermentador obligado, produce principalmente ácido láctico, etanol y CO₂. Este género se cataloga como susceptible a condiciones ácidas y su desarrollo a pH menores a 4.0 no es usual, lo que podría explicar su descenso en matrices más fermentadas en comparación con el aguamiel. Prácticamente todas las especies de este género producen dextrano a partir de sacarosa, lo que impacta en la viscosidad y textura de la bebida. *Zymomonas* abarca esencialmente a la especie *Z. mobilis*, resistente a etanol (hasta 10% (v/v)) que fermenta glucosa, fructosa y sacarosa para producir etanol y CO₂ (Paradh, 2015) y que puede además producir fructanos con un impacto en la textura del pulque (Escalante et al., 2016). *Periweissella*, también un género hetero fermentador, produce ácido láctico, CO₂, etanol y ácido acético. Algunas especies producen dextranos y bacteriocinas (Holzapfel & Wood, 2014). El grupo lactobacilli es capaz de fermentar principalmente pentosas y hexosas para producir ácido láctico (en géneros homo fermentadores) y ácido acético, etanol, CO₂ y ácido fórmico (en géneros hetero fermentadores). Asimismo, tiene un impacto en el sabor del pulque y algunas especies pueden ser consideradas probióticos (Holzapfel & Wood, 2014). *Fructobacillus* abarca bacterias dependientes de fructosa y que pueden clasificarse como hetero fermentadores que producen ácido láctico, ácido acético, CO₂ y etanol (Holzapfel & Wood, 2014). La familia Moraxellaceae es generalmente reconocida como saprófita, incluyendo a los géneros *Acinetobacter* y

Alkanindiges encontrados en la región de estudio (Fernández-Garayzábal et al., 2024). El género *Hafnia* ha sido aislado de diferentes alimentos fermentados y entornos animales, incluidos el tracto gastrointestinal humano. Su patogenicidad no ha sido del todo aclarada, pero se reconoce como un patógeno no común en humanos (Janda & Abbott, 2006; Smith, 2014). Ambas *Acetobacter* y *Komagataeibacter* son considerados como bacterias productoras de ácido acético (Chen, 2021; Yamada, 2016). *Kluyveromyces* y *Kazachstania*, reconocidas dentro del grupo de levaduras no-*Saccharomyces*, se asocian como complemento de la fermentación alcohólica llevada a cabo principalmente por *Saccharomyces* (y también *Zymomonas*), contribuyendo en la formación del aroma de la bebida con ésteres, alcoholes superiores y ácidos grasos (Maicas, 2020; Wang et al., 2023).

Es importante mencionar que, aunque algunos patógenos fueron detectados en aguamiel (*Shigella flexneri* y un *Campylobacter* sp. no clasificado, ambos en la estación 4.1), estos presentan una frecuencia relativa menor a 0.005% en la muestra. En esta misma muestra, *Aspergillus flavus* fue también detectado en las estaciones 2.1, 3.1 y 5.1, pero con una frecuencia relativa menor a 0.08%. En pulque joven se detectó otro patógeno (*Listeria monocytogenes* también en la estación 4.1), pero igualmente con una frecuencia relativa de 0.003%. En el iniciador de la fermentación únicamente se detectó *A. flavus* en la estación 5.1 con una frecuencia relativa menor a 0.003%. Estos resultados señalan que los microorganismos patógenos podrían ingresar a las matrices durante el proceso, pero por las condiciones adversas de las matrices, no se favorece su desarrollo, ni supervivencia. Dado que el acercamiento es molecular, no es posible asegurar que los patógenos se encontraran viables en la bebida.

Varios de los grupos microbianos identificados en nuestro estudio (como parte de los distintos núcleos identificados) han sido también detectados en otras regiones. Por ejemplo, Astudillo-Melgar et al. (2023) propone un núcleo microbiano para la fermentación de pulque en Morelos, México, con el cual se comparten algunos

microorganismos con excepción de los géneros *Gluconobacter*, *Hanseniaspora* y *Obesumbacterium* (aunque es importante mencionar que este género está cercanamente relacionado con el género *Hafnia*, Paradh, 2015) como exclusivos para el núcleo de Morelos y los géneros *Komagataeibacter*, *Alkanindiges*, *Fructobacillus* y las familias Moraxellaceae y Enterobacteriaceae como exclusivos de los núcleos detectados en la región de nuestro estudio en Querétaro (Figura 16A).

En el estudio de la diversidad microbiana de Rocha-Arriaga et al. (2020) en la localidad de Tepeapulco, Hidalgo se identifica un grupo de microorganismos (microorganismos presentes en todas las etapas del proceso en la región: aguamiel, pulque joven y un iniciador de la fermentación denominado contrapunta). Existen también microorganismos en común entre los núcleos que identificamos en Querétaro con este núcleo de referencia; los géneros bacterianos *Gluconobacter*, *Halomicronema*, *Marivitia*, *Serratia* y los fúngicos *Dekkera* y *Westerdykella* se encuentran como exclusivos para Hidalgo. Hay algunas discrepancias con géneros aparentemente exclusivos para Hidalgo: el género *Sphingomonas*, ya que es probable que su asociación se hiciera de manera errónea, dada la cercanía que existe con el género *Zymomonas* que también ha sido detectado en otras regiones productoras (Paradh, 2015; White et al., 1996); el género *Acinetobacter*, pues también se identifica en Querétaro, pero como miembro de la familia Moraxellaceae, también identificada en Querétaro; y finalmente el género *Enterobacter*, que también fue detectado pero como miembro de la familia Enterobacteriaceae en Querétaro. Como estrictamente exclusivos para Querétaro se detectan los géneros *Komagataeibacter*, *Alkanindiges* y *Fructobacillus* (Figura 16B).

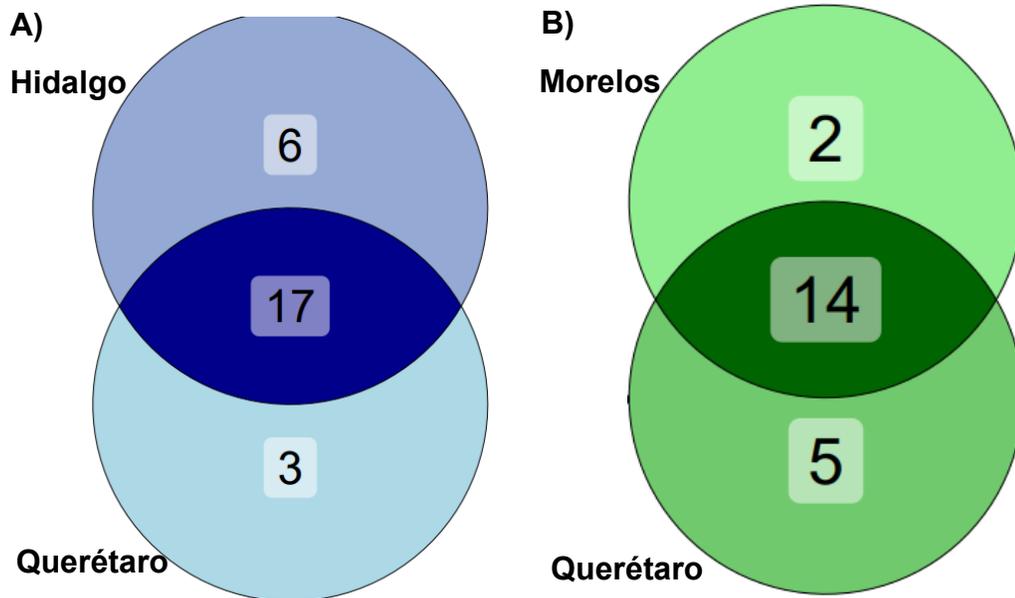


Figura 16. **A)** Número de grupos microbianos exclusivos y comunes entre aquellos detectados en Hidalgo (Rocha-Arriaga, et al., 2020) y la región queretana de este estudio. **B)** Número de grupos microbianos exclusivos y comunes entre aquellos detectados en Morelos (Astudillo-Melgar et al., 2023) y la región queretana de este estudio.

Abarcando la discusión previa, se identifican exclusivamente para la región de Querétaro según nuestro estudio a los géneros *Komagataeibacter*, *Alkanindiges* y *Fructobacillus*. De igual forma, es posible apreciar un escenario en que el pulque producido en ciertas regiones podría ser bien definido, por lo menos a nivel de la diversidad microbiana en cuanto a núcleos. Estudios más amplios y armonizados entre regiones productoras y especies de *Agave* permitirán confirmar las hipótesis en este estudio plasmadas.

5.5. Análisis de diversidad

Procediendo primero con diversidad alfa para bacterias (Cuadro 20), el índice Chao1 muestra una mayor diversidad en las muestras fermentadas (pulque joven y el iniciador de la fermentación) en comparación con aguamiel, excepto para la estación 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes). En el caso del índice de

uniformidad Simpson, en general, se asocia mayor diversidad en las muestras fermentadas en comparación con aguamiel (excepto en la estación 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)); finalmente, con respecto al índice Shannon-Wiener, se marca mayor diversidad en aguamiel que las muestras fermentadas (excepto para las estaciones 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) en este caso), contrario a lo hallado con los índices Chao1 y Simpson.

Con respecto a la diversidad alfa fúngica (Cuadro 20), el índice Chao1 indica (contrario a lo hallado en el análisis bacteriano) mayor diversidad en aguamiel con respecto a las muestras fermentadas (excepto en la estación 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes)). El índice de Simpson no muestra un patrón claro entre las muestras: mayor diversidad en aguamiel para las estaciones 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués), mientras que el escenario opuesto ocurre para el resto de las estaciones (mayor diversidad en muestras fermentadas). Para el índice Shannon Wiener, se asocia mayor diversidad en aguamiel sobre las muestras fermentadas (excepto en la estación 4.1 (El Lobo, El Marqués)), lo que coincide con lo observado en el índice Chao1 previamente discutido.

Con relación a la diversidad beta, el índice de Jaccard es empleado en esta ocasión dada su independencia con respecto a la uniformidad de los microorganismos en una muestra dada, esto dado el cambio en la uniformidad para diferentes taxones a diferentes tiempos en la fermentación del pulque (demostrado en Rocha-Arriaga et al., 2020 y Astudillo-Melgar et al., 2023). En nuestro estudio, se muestrearon diferentes tiempos de fermentación, por lo tanto, se busca descartar esta variable en los análisis de diversidad beta y considerar únicamente la presencia o ausencia de ciertos grupos microbianos entre las muestras.

Cuadro 20. Índices de diversidad alfa estimados.

Código	Muestra analizada	Chao1		Uniformidad Simpson		Shannon-Wiener	
		Bacteria	Levadura	Bacteria	Levadura	Bacteria	Levadura
2.1 (III)	Aguamiel (A)	41.0	43	0.08	0.08	2.21	2.20
	Iniciador (PS)	73.0	16	0.03	0.09	1.93	0.81
	Pulque joven (PY)	70.0	49	0.04	0.05	2.35	1.55
3.1 (IV)	Aguamiel (A)	45.5	137	0.04	0.01	1.40	0.94
	Iniciador (PS)	78.0	36	0.04	0.03	2.58	0.39
	Pulque joven (PY)	74.0	46	0.05	0.02	2.56	0.43
4.1 (I)	Aguamiel (A)	81.0	18	0.06	0.06	2.96	0.52
	Iniciador (PS)	102.2	10	0.02	0.14	2.02	0.72
	Pulque joven (PY)	98.0	5	0.02	0.27	1.87	0.71

Código a	Muestra analizada	Chao1		Uniformidad Simpson		Shannon-Wiener	
		Bacteria	Levadura	Bacteria	Levadura	Bacteria	Levadura
5.1 (VII)	Aguamiel (A)	72.2	44	0.06	0.04	2.83	1.04
	Iniciador (PS)	64.0	33	0.04	0.03	2.04	0.15
	Pulque joven (PY)	56.0	36	0.05	0.03	2.03	0.17

^a: referirse a Cuadro 11 para más detalles.

Procediendo entonces con el análisis de la diversidad beta bacteriana (Figura 17), en aguamiel existe cierta similitud entre muestras de una misma región y que emplean un mismo *Agave* (2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)), mientras que marca como únicas a las muestras 4.1 (El Lobo, El Marqués) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes). En el caso de pulque joven, 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués) se agrupan como similares aún al provenir de diferentes regiones y *Agave* empleado, marcando 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) como únicas. Finalmente, en el iniciador de fermentación se retoma un patrón similar al del aguamiel donde las muestras 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) muestran cierta similitud (proviendo ambas de la misma región y *Agave*) y las muestras 4.1 (El Lobo, El Marqués) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) se marcan como únicas.

En el caso de la diversidad beta fúngica (Figura 18), el aguamiel se agrupa aun proviniendo de diferentes regiones y *Agave* empleado (2.1 (Boyé, Cadereyta de

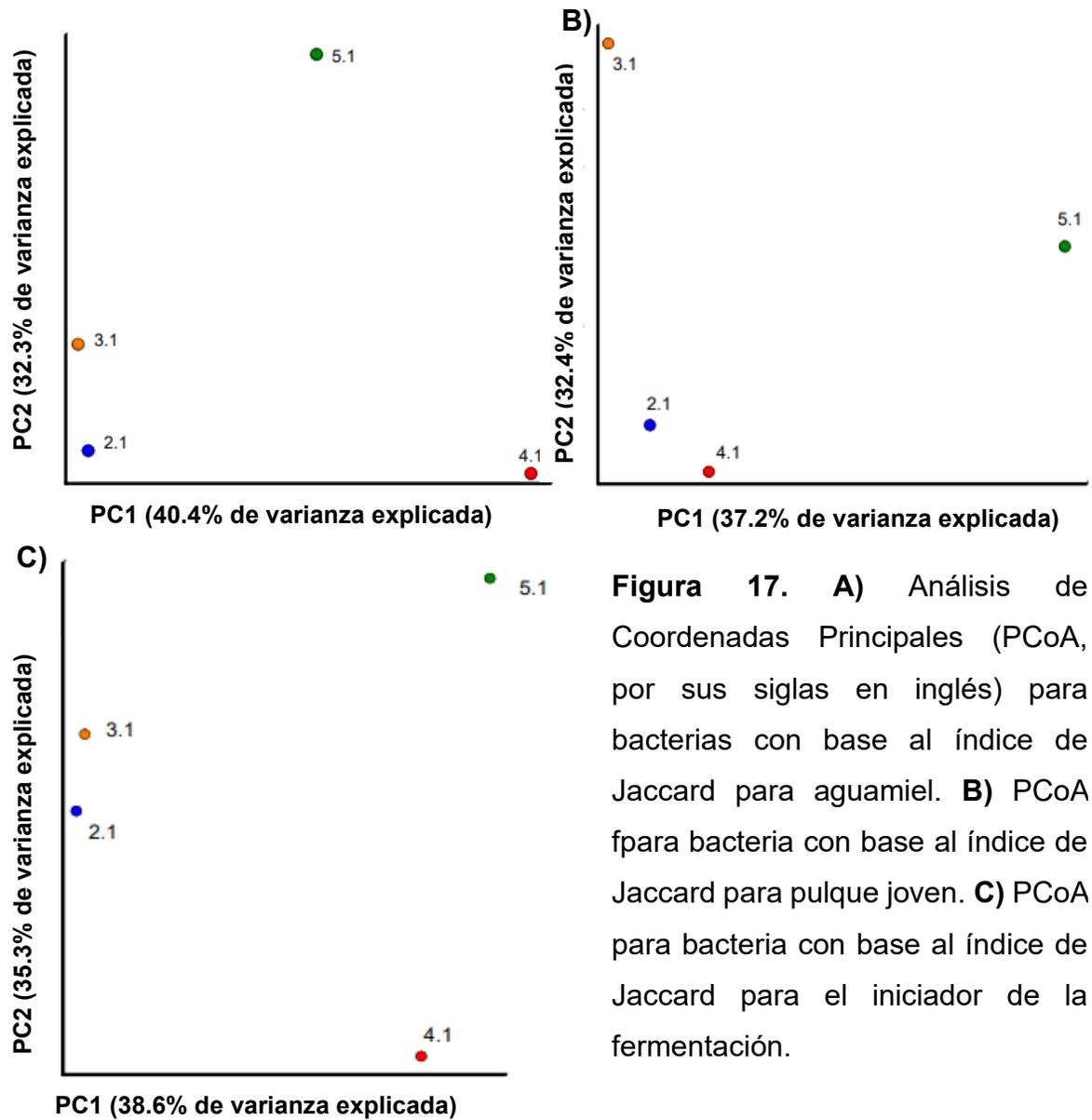


Figura 17. **A)** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) para bacterias con base al índice de Jaccard para aguamiel. **B)** PCoA para bacteria con base al índice de Jaccard para pulque joven. **C)** PCoA para bacteria con base al índice de Jaccard para el iniciador de la fermentación.

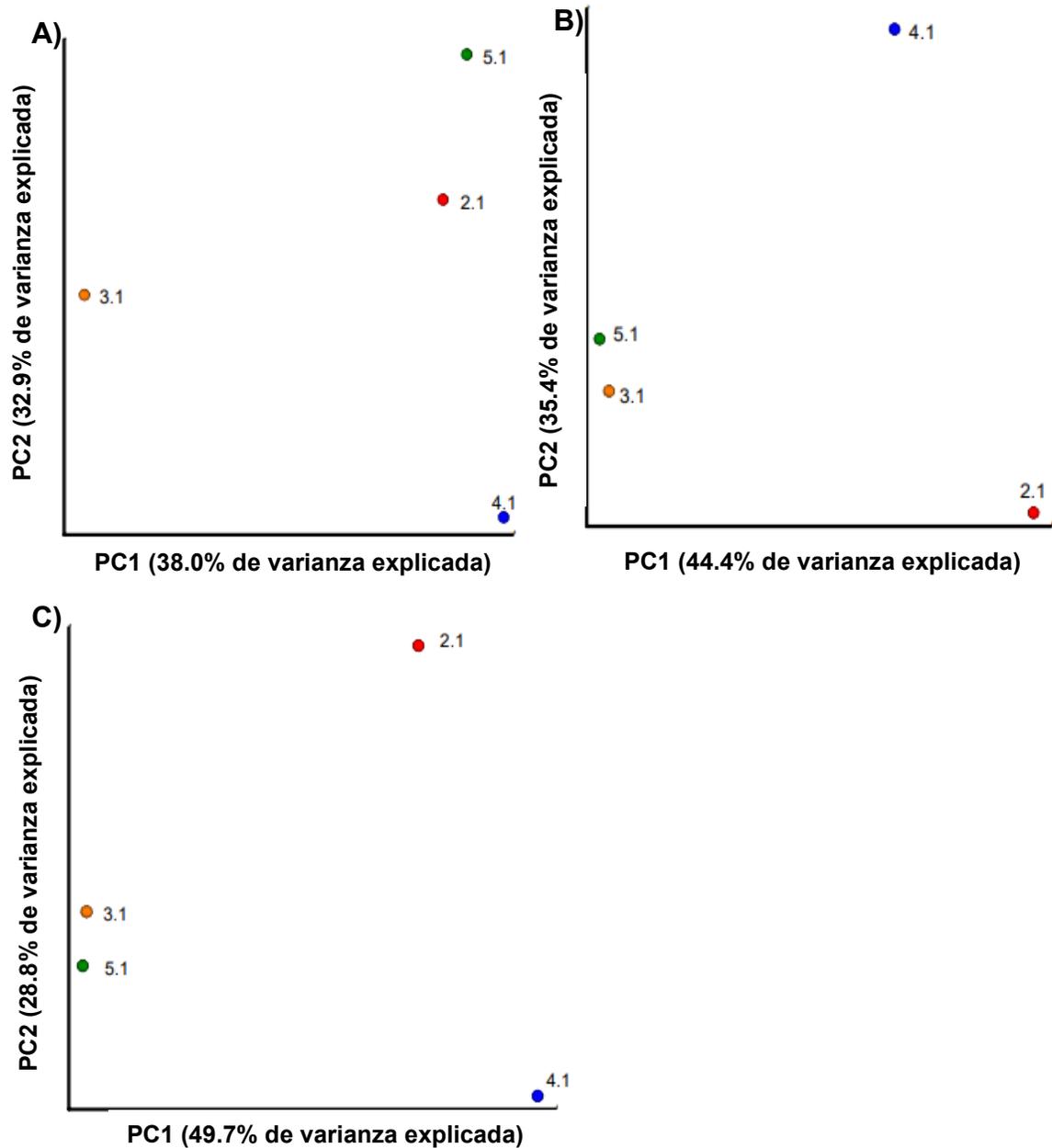


Figura 18. A) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para aguamiel. **B)** PCoA para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para pulque joven. **C)** PCoA para diversidad fúngica con base al índice de Jaccard para el iniciador de la fermentación.

Montes) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes)) y marcando 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués) como únicas. En pulque joven y el iniciador de la fermentación, igualmente se asocian muestras provenientes de diferentes regiones y *Agave* empleado (aunque en un patrón diferente al presentado en aguamiel) para las muestras 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes), marcando en este caso a 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) y 4.1 (El Lobo, El Marqués) como únicas.

Como se apreció en los análisis de PCA-K-medias (Figuras 9, 10 y 11 y 13B), cada matriz se puede clasificar prácticamente como única con base en el análisis de diversidad beta (Figuras 17 y 18), con excepciones puntuales. En las Figuras 17A y 17C para diversidad beta bacteriana, las muestras 2.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)-3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes) se agrupan por región y *Agave* empleado; en la Figura 18B y 18C para diversidad beta fúngica, 3.1 (Boyé, Cadereyta de Montes)-5.1 (Charco Frío, Cadereyta de Montes) se agrupan aun proviniendo de regiones distintas y empleando distintas especies de *Agave* y procesos de fermentación. Esta pieza de información permite ahondar en la idea de que, aun cuando cierta homogeneidad parece existir en las poblaciones microbianas o en cuanto a los parámetros físicos y químicos dentro de las asociaciones región-especie de *Agave*-proceso de fermentación, no es suficiente para poder considerar al pulque producido en una región como del todo similar o igual. De cualquier forma, la definición de estas “sugerencias de homogeneidad” permiten orientar los esfuerzos en la búsqueda de un mejor entendimiento de la bebida y promover una estandarización que respete la esencia tradicional o artesanal de la bebida.

6. Conclusiones

- El proceso de producción de la bebida en la región de Querétaro es similar, aunque existen diferencias en el proceso de fermentación y los parámetros estudiados con respecto a otras regiones productoras, probablemente asociado al uso de otras especies de *Agave* y otros procesos de fermentación presentes en dichas regiones.
- Aunque cierta homogeneidad existe en el pulque producido en la región, el proceso de fermentación, la especie de *Agave* empleada y la localidad tienen la mayor influencia en las características físicas, químicas y microbiológicas de las matrices fermentadas. Para el aguamiel, la especie de *Agave* puede explicar la heterogeneidad observada en esta matriz.
- El pulque joven en la región presentó un “núcleo de aroma” conformado por trece compuestos: etil acetato ; 3-metil-1-butanol; ácido hexanoico, etil éster; 2-etilhexil (2S)-2-hidroxiopropanoato; ácido acético; ácido octanoico, etil éster; etil 9-decenoato; ácido acético, 2-feniletil éster; ácido dodecanoico, etil éster; feniletil alcohol; ácido octanoico; ácido decanoico y etil 9- hexadecenoato.
- El perfil de volátiles en el pulque joven se ve mayormente afectado por la especie de *Agave* y la localidad o estación productora.
- La diversidad microbiana de las muestras permite la identificación de un “núcleo microbiano regional” (presentes en toda la región y todas las matrices): *Saccharomyces*, *Leuconostoc*, lactobacilli, *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Zymomonas*, *Alkanindiges* y *Fructobacillus*.
- Los géneros *Alkanindiges* y *Fructobacillus* constituyen microorganismos detectados de manera exclusiva en el núcleo microbiano regional evidenciado.
- Cada muestra analizada se puede considerar como única desde el punto de vista físico, químico y microbiológico, sin embargo, la identificación de núcleos microbianos y un núcleo de aroma, guían los esfuerzos hacia una mayor comprensión de la bebida y facilitan su definición preservando su origen artesanal.

7. Referencias

- Alcántara-Zavala, A.E., Figueroa-Cárdenas, J.D., Morales-Sánchez, E., Aldrete-Tapia, J.A., Arvizu-Medrano, S.M., & Martínez-Flores, H.E. (2019). Application of ohmic heating to extend shelf life and retain the physicochemical, microbiological, and sensory properties of pulque. *Food and Bioprocess Technology*, 118(-), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.007>
- Álvarez-Ríos, G.D., Figueredo-Urbina, C.J., & Casas, A. (2020). Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Pulque: Management of a Fermented Beverage in Michoacán, México. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030361>
- Aguado-Santacruz, G. A., Aguado-Rodríguez, D. L., Moreno-Gómez, B., Arroyo-González, D., Centeno-Jamica, D., Aguirre-Mancilla, C., & García-Montoya, E. (2022). Endomicrobiota bacteriana de agave pulquero (*Agave salmiana*). I. Aislamiento, frecuencia e identificación molecular. *Rev. Fitotec. Mex.*, 45(2), 243-250. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.2.243>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* [Online]. Disponible en línea en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arcanjo, N.M.O., Bezerra, T.K.A., Silva, F.L.H., & Madruga, M.S. (2015). Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for determining volatile compounds in red wines made from Isabel grapes (*Vitis labrusca*). *Food Science and Technology*, 35(4), 676-682. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6815>
- Astudillo-Melgar, F., Hernández-Chávez, G., Rodríguez-Alegría M.E., Bolívar, F., & Escalante, A. (2023). Analysis of the Microbial Diversity and Population Dynamics during the Pulque Fermentation Process. *Fermentation*, 9(342). <https://doi.org/10.3390/fermentation9040342>
- Backstrand, J.R., Allen, L.H., Martinez, E., & Pelto, G.H. (2001). Maternal consumption of *pulque*, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Public Health Nutrition*, 4(4), 883-891. <https://doi.org/10.1079/PHN2001130>

-Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvall C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Lofffield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, and Caporaso JG. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

-Borkulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

-Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

-Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. (2020). *Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial*. Diario Oficial de la Federación.

- Castro-Muñoz, R., & Garcia-Arce, Z.P. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8(35), 8-35. <https://doi.org/10.1186/s427779-021-00111-6>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022). *Alcohol Use in Pregnancy*. <https://www.cdc.gov/ncbddd/fasd/alcohol-use.html#:~:text=There%20is%20no%20known%20safe,exposed%20to%20alcohol%20before%20birth>.
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J.G. (2020). Genomic Profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(-). 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chemical Book. (2023). *Isobutyl decanoate*. Chemical Book. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB4373380_EN.htm
- Chen, P. (2021). Chapter 24- Lactic Acid Bacteria in Fermented Food. En D. Dhanasekaran, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Advances in Probiotics*. (pp. 397-416). Academic Press.
- Coordinators, N.R. (2017). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D12-D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1071>
- De Angelis-Juanicó, J. (n.d.). *TRABAJO PRÁCTICO 4: MÉTODO FEHLING CAUSSE BONNANS*. Escuela Técnica Raggio. <http://www.escuelaraggio.edu.ar/pagina%20de%20practicos%202021/TPS/5/alim-5/taller/GUIA%20TP%204.pdf>
- Debeluis, J. (4 de abril de 2023). *Using PCoA versus PCA*. QIIME 2 Forum. Revisado el 14 de mayo de 2024 en <https://forum.qiime2.org/t/using-pcoa-versus-pca/26019>
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M.I., Ordoñez-Acevedo, L.G., Flores-Flores, J.L., & Barba-De la Rosa, A.P. (2007). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic *Agave* Alcoholic Beverages by

Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technol. Biotechnol.*, 46(4), 448-455.

-Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in *Pulque*, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>

-Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>

-Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel-Flores, G., Matus-Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque Fermentation. En Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. (pp. 691-706). CRC Press.

-Escalante, A., López-Soto, D.R., Velázquez-Gutiérrez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7(1026). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

-Fernández-Garayzábal, J.F., Miguela-Villoldo, P., & Vela, A.I. (2022). *Moraxellaceae*. En M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey, & W.B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons.

-a Flavor & Extract Manufacturers Association. (2024). *Isobutyl alcohol aroma*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/isobutyl-alcohol>

-b Flavor & Extract Manufacturers Association. (2024). *Isoamyl alcohol*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/isoamyl-alcohol>

-c Flavor & Extract Manufacturers Association. (2024). *Ethyl octanoate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/ethyl-octanoate>

-d Flavor & Extract Manufacturers Association. (2024). *Isoamyl hexanoate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/isoamyl-hexanoate>

-e Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Phenethyl alcohol*. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/phenethyl-alcohol>

-f Flavor & extract Manufacturers. (2024). *Octanoic acid*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/octanoic-acid>

-g Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Ethyl palmitate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/ethyl-palmitate>

-h Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Decanoic acid*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/decanoic-acid>

-i Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Phenethyl octanoate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/phenethyl-octanoate>

-j Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *9,12-Octadecadienoic acid (48%) and 9,12,15-octadecatrienoic acid (52%)*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/912-octadecadienoic-acid-48-91215-octadecatrienoic-acid-52>

-k Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Ethyl myristate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/ethyl-myristate>

-l Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Ethyl 3-phenylpropionate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/ethyl-3-phenylpropionate>

-m Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Phenethyl acetate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/phenethyl-acetate>

-n Flavor & Extract Manufacturers. (2024). *Ethyl hexanoate*. FEMA. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/ethyl-hexanoate>

-Gobierno de México. (2023). *Servicios que ofrece el IMPI. Marcas. Denominaciones de Origen*. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. <https://www.gob.mx/impi/acciones-y-programas/servicios-que-ofrece-el-impi-marcas-denominaciones-de-origen#:~:text=Se%20entiende%20por%20denominaci%C3%B3n%20de,factores%20naturales%20y%20los%20humanos>.

-Gobierno municipal El Marqués. (2022). *El Marqués, sede del foro “Maguey y tradición Queretano”*. Boletín Comunicación El Marqués. <https://elmarques.gob.mx/2022/06/11/el-marques-sede-del-foro-maguey-y-tradicion-queretano/>

-Gómez-Aldapa, C.A., Díaz-Cruz, C.A., Villarruel-López, A., Torres-Vitela, M.R., Añorve-Morga, J., Rangel-Vargas, E., Cerna-Cortes, J.F., Viguera-Ramírez, J.G., & Castro-Rosas. (2011). Behavior of *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* during Production of Pulque, a Traditional Mexican Beverage. *Journal of Food Protection*, 74(4), 580-587. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-382>

-Gómez-Aldapa, C.A., Díaz-Cruz, C.A., Villarruel-López, A., Torres-Vitela, M.R., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2012). Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage. *International Journal of Microbiology*, 154(1), 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.027>

-a Google Earth. (n.d.). [*El Lobo, Querétaro, México, 20°43'39"N, 100°12'05"W, 2,010 meters above sea level*]. Consultado el 24 de abril de 2023 de <https://earth.google.com/web/search/El+Lobo,+Qro./@20.7276446,-100.2033188,2020.30099888a,4201.20052659d,35y,0h,0t,0r/data=CncaTRJHCiQweDg1ZDM2MTBmZWM1ZGI0Mjc6MHg2YjQ2OGE0NmE2MmRhNDMzQS7MnfS5NEAhaverAN8MWcAqDUVslExvYm8sIFFyby4YAiABliYKJAnJs9buPb40QBFxb7djRbY0QBn4e98Z0wpZwCH91ywL-g5ZwDoDCgEw>.

-b Google Earth. (n.d.). [*Boyé, Querétaro, México, 20°40'59"N, 99°44'05"W, 2,083 meters above sea level*]. Consultado el 24 de abril de 2023 de https://earth.google.com/web/search/Boy%c3%a9,+Qro./@20.6826001,-99.73393565,1093.69482328a,4202.87070626d,35y,0h,0t,0r/data=CnYaTBJGCiUweDg1ZDM4NTk5OGZjZGM4MWI6MHg1Yzg3YTdmNGNmMWIzZDZiGVbcE39vrjRAIVHdt7Vg71jAKgtCb3nDqSwgUXJvLhgCIAEiJgokCaWN1hLLvjRAEexZZz_CtRAGYoCHseoClnAIZ9JmJJdD1nAOgMKATA.

- c Google Earth. (n.d.). [*Charco Frío, Querétaro, México, 20°47'26"N, 99°42'06"W, 2,130 meters above sea level*]. Consultado el 24 de abril de 2023 de [https://earth.google.com/web/search/Barrio+de+Guadalupe,+Quer%
c3%a9taro/@20.7905996,-99.7019238,2148.4047989a,784.02702537d,35y,0h,0t,0r/data=CmUaOxI1CiUweDg1ZDM4OWU0ZDYzMzBiOGQ6MHg5MTEzZWnkNTI0NmU5OTJKgxDaGFyY28gZnLDrW8YAiABliYKJAIXkdenTLM0QBFDTeYVMKo0QBmjiW-SmexYwCGHhQclWPFYwDoDCgEw](https://earth.google.com/web/search/Barrio+de+Guadalupe,+Quer%c3%a9taro/@20.7905996,-99.7019238,2148.4047989a,784.02702537d,35y,0h,0t,0r/data=CmUaOxI1CiUweDg1ZDM4OWU0ZDYzMzBiOGQ6MHg5MTEzZWnkNTI0NmU5OTJKgxDaGFyY28gZnLDrW8YAiABliYKJAIXkdenTLM0QBFDTeYVMKo0QBmjiW-SmexYwCGHhQclWPFYwDoDCgEw).
- Gubert, C., Kong, G., Renoir, T., & Hannan, A.J. (2020). Exercise, diet and stress as modulators of gut microbiota: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, 134(2020). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104621>
- Halko, N., Martinsson, P.-G., Shkolnisky, Y., & Tygert, M. (2011). An Algorithm for the Principal Component Analysis of Large Data Sets. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 33(5), 2589-2594. <https://doi.org/10.1137/100804139>
- Huang, L., Zhu, X., Zhou, S., Cheng, Z., Shi, K., Zhang, C., & Shao, H. (2021). Phthalic Acid Esters: Natural Sources and Biological Activities. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/toxins13070495>
- Holzapfel, W.H., & Wood, J.B. (2014). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). *Marco Geostadístico, diciembre 2018*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. https://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/entidades/div_municipal/queretarompioscolor.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). *División municipal*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. https://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/queret/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=22
- a Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). *Marco Geoestadístico Nacional, diciembre 2018*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

https://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/nacional/div_territorial/nacionalestados_s n.pdf

-b Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). *Aspectos Geográficos. Querétaro*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_22.pdf

-International Organisation of Vine and Wine. (2022). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis* (2022). International Organisation of Vine and Wine.

-Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution floral. *Bull. Soc. Vard. Sci. Nat.*, 44(-), 223-270.

-Jager J., Putnick, D.L., & Bornstein, M.H. (2017). More than just convenient: the scientific merits of homogeneous convenience samples. *Monographs of the Society for Research in child Development*, 82(2). <https://doi.org/10.1111/mono.12296>

-James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2023). 12. Unsupervised Learning. En G. James, D. Witten, T. Haste, & R. Tbshirani. (Eds.), *An Introduction to Statistical Learning* (pp. 495- 550). Springer.

-Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The genus *Hafnia*: from soup to nuts. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 12–28. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.12-28.2006>

-Katoch, K., & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

-Kataria, T.K., Sosa-Morales, M.E., Olvera-Cervantes, J.L., Rojas-Laguna, R., & Corona-Chavez, A. (2019). Dielectric properties of *pulque* at different temperatures from 0.1 to 25 GHz, *Journal of microwave power and electromagnetic energy*, 53(4), 215-224. <https://doi.org/10.1080/08327823.2019.1677432>

-Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>

- Kosma, I. S., Kontominas, M. G., & Badeka, A. V. (2020). The Application of Chemometrics to Volatile Compound Analysis for the Recognition of Specific Markers for Cultivar Differentiation of Greek Virgin Olive Oil Samples. *Foods*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/foods9111672>
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115-175). John Wiley.
- Legendre, P., & Legendre, L. (2012). *Numerical Ecology* (Third). Elsevier.
- Maicas S. (2020). The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Martínez-Ibarra, A., Martínez-Razo, L.D., MacDonald-Ramos, K., Morales-Pacheco, M., Vázquez-Martínez, E.R., López-López, M., Rodríguez-Dorantes, M., & Cerbón, M. (2021). Multisystemic alterations in humans induced by bisphenol A and phthalates: Experimental. Epidemiological and clinical studies reveal the need to change health policies. *Environmental Pollution*, 271(2021). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116380>
- Massenet, T., Muller, H., Dubois, L., Stefanuto, P.-H., & Focant, J.-F. (2020). *Profiling the ester aroma of fruity beers using comprehensive two dimensional gas chromatography: a comparison of flow and cryogenic modulators*. (ULiège - Université de Liège, CHIM0657-1 Techniques Émergentes en Sciences de Séparation). <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/248001/1/Article%20-%20T.%20Massenet%20%26%20H.%20Muller%20%28corrected%20version%29.pdf>
- McDonald, D., Clemente, J. C., Kuczynski, J., Rideout, J. R., Stombaugh, J., Wendel, D., Wilke, A., Huse, S., Hufnagle, J., Meyer, F., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-7>
- McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. En S. van der Walt & Jarrod Millman (Eds.), *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* (pp. 51–56). SciPy Proceedings.

- Medina-Mendoza, C., Roldán-Cruz, E.I., & Vázquez-Jahuey, M. (2022). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y pulque del Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 19(4). <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i4.1412>
- Morata, A., Loira, I., González, C., Bañuelos, M.A., Cuerda, R., Heras, J.M., Vaquero, C., & Suárez-Lepe, J.A. (2022). Chapter 11-Biological acidification by *Lachancea thermotolerans*. En A. Morata (Ed.), *White Wine Technology* (pp. 131-142). Academic Press.
- Moreno-Terrazas, R., Escalante, A., Verdugo-Valdez, A.G., De la Rosa, M., Ortiz-Basurto, R.I., Orantes-García, C., Palafox-González, L., Castro-Díaz, A.S., & Lappe-Oliveras, P. (2017). Sección I. Bebidas refrescantes y alcohólicas de agave. En A.C. Gschaedler Mathis (Ed.), *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México*. (pp. 123-164). AGARED.
- National Health Service. (2020). *Drinking alcohol while pregnant*. Keeping well in pregnancy. <https://www.nhs.uk/pregnancy/keeping-well/drinking-alcohol-while-pregnant/>
- Ortíz-Basurto, R.I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M.P. (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(10), 3682-3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Paradh, A.D. (2015). 8-Gram-negative spoilage bacteria in brewing. En A.E. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology*. (pp. 175-194). Woodhead Publishing.
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12(85), 2825–2830.
- Perflavory. (2021). *Isopropyl decanoate, decanoic acid, 1.methylethyl ester*. Perflavory. <https://www.perflavory.com/docs/doc1450111.html>

- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PloS One*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- a Pubchem. (2024). *2-Hydroxycyclopentadecanone*. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Consultado el 4 de mayo de 2024 en May 4, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/543400>
- b Pubchem. (2024). *Propyl decanoate (Compound)*. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Consultado el 4 de mayo de 2024 en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/121739>
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L.D., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241(2020), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>
- a Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1972). *Aguamiel. Hydromel. Normas Mexicanas (NMX-V-022-1972)*. Diario Oficial de la Federación.
- b Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1972). *Pulque manejado a granel (NMX-V-037-1972)*. Diario Oficial de la Federación.
- a Secretaría de Salud. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Diario Oficial de la Federación.
- b Secretaría de Salud. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*. Diario Oficial de la Federación.
- c Secretaría de Salud. (1994). *NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Diario Oficial de la Federación.

- a Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 1 mayo de 2023 en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- b Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). *Estadística de Producción Agrícola de 2021*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 1 de mayo de 2023 en http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2022). *Estadística de la Producción Agrícola 2022*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 6 de octubre de 2024 en <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2023). *Estadística de la Producción Agrícola 2023*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 6 de octubre de 2024 en <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Shannon, C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Smith, J.L. (2014). *Hafnia*, The Genus. En C.A. Batt, & M.L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. (pp. 117-120). Academic Press.
- Starowicz, M. (2021). Analysis of Volatiles in Food Products. *Separations*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/separations8090157>
- Sun, T., Chin, J.H., Yu, B., Curran, P., & Liu, S.Q. (2012). Determination of Flavor Esters in Enzymatically Transformed Coconut Oil. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6), 654-660. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2012.00660.x>
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N.F., Velasco-Almendarez, S.I., & Montville, T.J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 4(2012), 140-144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

- Vázquez-Baeza, Y., Pirrung, M., Gonzalez, A., & Knight, R. (2013). EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data. *Gigascience*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-16>
- Vázquez-Baeza, Y., Gonzalez, A., Smarr, L., McDonald, D., Morton, J. T., Navas-Molina, J. A., & Knight, R. (2017). Bringing the Dynamic microbiome to life with animations. *Cell Host & Microbe*, 21(1), 7-10. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.009>
- Vinderola, G., Sanders, M.E., & Salminen, S. The Concept of Postbiotics. *Foods*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/foods11081077>
- Wang, X., Fan, G., Peng, Y., Xu, N., Xie, Y., Zhou, H., Liang, H., Zhan, J., Huang, W., & You, Y. (2023). Mechanisms and effects of non-*Saccharomyces* yeast fermentation on the aromatic profile of wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 124(2023). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105660>
- Weiss, S., Xu, Z. Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J. R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E. R., & Knight, R. (2017). Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*, 5(27). <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>
- Weiss, T., Barretto, R., Chen, G., Hong, S., Li, Y., Zheng, Y., Sun, X.S., & Wang, D. (2023). Blue, red and white maize as a sustainable resource for production of distilled spirit. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14(2023). <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100770>
- White, D.C., Sutton, S.D., & Ringelberg, D.B. (1996). The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol.*, 7(3). [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(96\)80034-6](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(96)80034-6). PMID: 8785434.
- Wickham, H. (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40(1), 1-29. <https://doi.org/10.18637/jss.v040.i0>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Lin, T., Tkahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., Van den Brand, T., & Posit, PBC. (2024). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*. (version 3.5.0) [R Package]. CRAN.

- Wickham, H. (2020). *Flexibly Reshape Data: A Reboot of the Reshape Package*. (Version 1.4.4) [R Package]. <https://github.com/hadley/reshape>
- a Wickham, H., Pedersen, T., & Seidel, D. (2023). *scales: Scale Functions for Visualization*. (Version 1.3.0.) [R package]. <https://scales.r-lib.org>, <https://github.com/r-lib/scales>
- b Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. (Version 2.5.0) [R Package]. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>
- Yamada, Y. (2016). Systematics of acetic acid bacteria. En K. Matsushita, N. Tonouchi, & A. Okamoto-Kainuma (Eds.), *Acetic acid bacteria: Ecology and physiology*. (pp. 1-50). Springer.
- Zhao, Y., Liao, P., Zhang, Y., Wang, X., Kang, Q., Chen, X., Sun, Y., Jin, Y., Yu, J., Li, H., Zhang, N., Sun, B., & Sun, J. (2024). Characterization of the key aroma compounds in a novel Qingke baijiu of Tibet by GC-MS, GCxGC-MS and GC-O-MS. *Food Chemistry Advances*, 4(2024). <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100589>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.004>

8. Anexos

Anexo I. Cuadro 1. Parámetros físicos, químicos y microbiológicos para aguamiel muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Viscosidad (cP)	2.28 ± 0.05	1.28 ± 0.04	2.00 ± 0.02	1.84 ± 0.007	1.78 ± 0.02	1.63 ± 0.00	2.08 ± 0.06	1.55 ± 0.00	1.32 ± 0.01	1.47 ± 0.04
Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	0.160 ± 0.032	0.025 ± 0.006	0.131 ± 0.006	0.099 ± 0.000	0.180 ± 0.000	0.112 ± 0.006	0.119 ± 0.003	0.027 ± 0.013	0.063 ± 0.000	0.058 ± 0.006
pH	4.90 ± 0.01	8.15 ± 0.06	6.40 ± 0.06	4.84 ± 0.01	4.38 ± 0.07	5.86 ± 0.00	4.70 ± 0.01	6.44 ± 0.01	7.41 ± 0.01	6.70 ± 0.01
°Brix (g sólidos solubles /100 mL)	11.00 ± 0.00	12.50 ± 0.71	15.50 ± 2.12	13.50 ± 0.00	14.00 ± 0.00	14.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00	12.00 ± 0.00	12.00 ± 0.00
Coliformes totales ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	2.3	2.3	2.0	2.2	1.2	1.7	1.7	1.8	1.3 V.E.	>2.5
Bacterias ácido lácticas ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	7.9	6.3	6.7	7.2 V.E.	6.5	7.5	8.4	6.9	7.4	6.6
Levaduras ^a (log ₁₀ (UFC/mL))	4.4	4.5	4.7	4.2	4.7	4.4	4.2	5.0 V.E.	4.00	3.7 V.E.

Promedio ± desviación estándar se presentan para cada parámetro, excepto para los microbiológicos. En este último caso, los métodos de cuantificación aplicables no requieren el cálculo de la desviación estándar para expresar el resultado final. a: V.E. indica valor estimado.

Cuadro 2. Parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el iniciador de la fermentación muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Viscosidad (cP)	1.40 ± 0.01	1.445 ± 0.01	1.46 ± 0.04	1.50 ± 0.01	1.70 ± 0.17	1.72 ± 0.05	1.89 ± 0.02	1.81 ± 0.01	1.45 ± 0.00	No muestreado
Acidez titulable (g ácido láctico/100 mL)	0.51 ± 0.21	0.45 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.30 ± 0.00	0.47 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.41 ± 0.00	0.28 ± 0.04	
Carbohidratos reductores directos (g equivalentes de dextrosa/100 mL) ^a	0.13	2.00 ± 0.00	<0.12	<0.104	1.48 ± 0.00	2.3 ± 0.11	0.28	0.23	0.16 ***	
pH	4.14 ± 0.01	3.51 ± 0.06	3.91 ± 0.01	3.58 ± 0.01	3.83 ± 0.03	3.80 ± 0.00	3.90 ± 0.02	3.62 ± 0.01	3.88 ± 0.00	
°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	4.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	6.50 ± 0.00	4.00 ± 0.00	
Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/mL))	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	
Bacterias ácido lácticas (log ₁₀ (UFC/mL)) ^b	6.4	5.5	5.4	6.30 V.E.	6.8	7.6	7.4	7.3	6.7	
Levaduras (log ₁₀ (UFC/mL))	7.5	7.0	7.4	6.3	7.2	5.7	7.4	7.5	5.5	

Promedio ± desviación estándar se presentan para cada parámetro, excepto para los microbiológicos. En este último caso, los métodos de cuantificación aplicables no requieren el cálculo de la desviación estándar para expresar el resultado final. a: Algunos valores carecen de desviación estándar, ya que por la naturaleza de la determinación Fehling Causse Bonnans no fue posible obtener suficiente muestra para poder evaluar dos submuestras. b: V.E. indica valor estimado.

Cuadro 3. Parámetros físicos, químicos y microbiológicos para el pulque joven muestreado en diferentes regiones productoras de Querétaro.

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
Especie de <i>Agave</i> muestreada	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	5.1	5.2
Viscosidad (cP)	1.50 ± 0.00	1.44 ± 0.04	1.46 ± 0.02	1.56 ± 0.02	1.56 ± 0.04	1.64 ± 0.00	2.02 ± 0.01	1.78 ± 0.02	1.44 ± 0.007	1.49 ± 0.00
Acidez titulable (g ácido láctico /100 mL)	0.36 ± 0.06	0.36 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.30 ± 0.00	0.26 ± 0.02	0.47 ± 0.08	0.34 ± 0.00	0.26 ± 0.01	0.37 ± 0.01
Carbohidratos reductores directos (g equivalentes de dextrosa/100 mL) ^a	0.31	2.20 ± 0.02	2.30 ± 0.24	2.80 ± 0.00	1.69 ± 0.02	2.10 ± 0.39	2.30 ± 0.15	1.80 ± 0.05	0.26 ± 0.00	<0.10
pH	4.25 ± 0.00	3.72 ± 0.02	4.15 ± 0.07	3.96 ± 0.01	3.85 ± 0.23	4.10 ± 0.00	3.98 ± 0.02	3.71 ± 0.00	3.88 ± 0.01	3.52 ± 0.02
°Brix (g sólidos solubles/100 mL)	4.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	7.50 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00
% Etanol (%v/v)	1.63 ± 0.02	1.90 ± 0.08	2.21 ± 0.22	1.71 ± 0.04	1.10 ± 0.07	1.07 ± 0.27	2.12 ± 0.17	1.87 ± 0.19	1.76 ± 0.44	1.40 ± 0.21
Ácido acético (mg/100 mL) ^b	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.67 ± 0.14	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Coliformes totales (log ₁₀ (UFC/mL)) ^c	1.0	1.0	<0.3	1.2 V.E.	<0.3	1.8	<0.3	0.8	<0.3	<0.3

Estación de muestreo	El Marqués		El Marqués		Boyé, Cadereyta de Montes		Boyé, Cadereyta de Montes		Charco Frío, Cadereyta de Montes	
Especie de <i>Agave</i> muestreada	<i>A. mapisaga</i>		<i>A. americana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. mapisaga</i>	
Código	4.1	4.2	1.1	1.2	2.1	Código	4.1	4.2	1.1	1.2
Bacterias ácido lácticas (log₁₀(UFC/mL))	5.9	5.8	6.6	7.5	7.7	9.3	8.0	7.9	6.7	6.0
Levaduras (log₁₀(UFC/mL))^c	7.8	6.5	6.9	6.2	6.8	5.0 V.E.	7.1	7.0	5.1	5.0
<p>Promedio ± desviación estándar se presentan para cada parámetro, excepto para los microbiológicos. En este último caso, los métodos de cuantificación aplicables no requieren el cálculo de la desviación estándar para expresar el resultado final. a: Algunos valores carecen de desviación estándar, ya que por la naturaleza de la determinación Fehling Causse Bonnans no fue posible obtener suficiente muestra para poder evaluar dos submuestras. b: 0.01 mg/100 mL corresponde al límite de detección de la técnica. c: V.E. indica valor estimado.</p>										

