



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

TEMA: *“Denominación de origen y estudio metagenómico del Pulque del Estado de Hidalgo, México”*

FORMA DE TITULACIÓN: TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

Carolina Rocha Arriaga

TUTOR INTERNO:

Dra. Harumi Shimada Beltrán

TUTORES EXTERNOS

Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez

Dr. Luis David Alcaraz Peraza





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Les agradezco su total apoyo y compromiso para realizar este proyecto colaborativo ya que sin su ayuda no se hubiese realizado bajo la dirección de los doctores Alfredo Cruz Ramírez y Luis David Alcaraz. Entre estas personas quiero reconocer el especial aporte que tuvieron las siguientes personas:

Al Dr. Alfredo Cruz Ramírez

Al Dr. Luis David Alcaraz Peraza

A la Mtra. Daniela Shamayim Martínez Sánchez

A la Mtra. Annie Espinal Centeno

Ex-presidente de Tepeapulco Ing. Alberto Franco Ramírez

Al Sr. Mario Islas Palacios

A la regidora Claudia Islas Méndez

Al Ing. Alfonso Alvarado Gutiérrez

A Raúl Guerrero Bustamante

A profesor Miguel Angel Monroy

A los vigías de Tepeapulco

A la familia Cruz Ramírez

Y especialmente a Jay T

Índice general

Resumen	1-2
Introducción	3-8
Definición de Pulque	3-4
Proceso de producción	4-6
Producción artesanal	6-7
Producción industrial.....	7-8

Capítulo I “Trabajo técnico justificativo para promover la denominación de origen del pulque: caso Hidalgo”

Antecedentes	10-23
Denominación de Origen	10-12
Proceso para solicitar la denominación de Origen	12-13
Características fisicoquímicas del aguamiel y pulque basados en las normas de calidad NMX-V-022-1972 y NMX-V-037-1972	13-18
Características organolépticas del pulque	18-19
Antecedentes Histórico-geográficos de producción de pulque	19-23
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	24
Metodología	24-25
Colecta de las muestras	24
Determinaciones fisicoquímicas	24-25
Estudios organolépticos	25
Resultados	26-32
Determinaciones fisicoquímicas	26-28
Estudios organolépticos	28-31
Perfil sensorial del pulque de Hidalgo	32
Discusión	32-33
Conclusión	33

Capítulo II “Dinámica y diversidad de microorganismos presentes en aguamiel, contrapunta y pulque”

Antecedentes	35-53
Microorganismos reportados previamente	35-46
Secuenciación, metagenómica y “metabarcoding”	46-47
El gen 16S del RNA ribosomal (rRNA)	47-48
ITS	48-49
Clusterización de secuencias para la obtención de OTUs y asignación de filotipos	50
Procesamiento de datos	50-51
Análisis estadísticos de la diversidad	51-53
Curvas de rarefacción	51
Análisis de agrupamiento	51-52
Diagramas de Venn	52
Índices de diversidad	52-53
Justificación	53-54
Hipótesis	54
Objetivo general	54
Objetivos particulares	54
Metodología	54-59
Colecta y procesamiento de las muestras	55-56
Extracción de ácidos nucleicos	56-57
Amplificación por PCR	57-58
Secuenciación	58
Filtrado de calidad de los datos	58-59
Clusterización de secuencias para la obtención de OTUs y asignación de filotipos	59
Análisis estadísticos	59
Papel biológico de los géneros más abundantes	59
Resultados	59-78
Calidad del muestreo metagenómico y análisis de diversidad microbiana en la fermentación del pulque	59-64
Análisis de ordenamiento y la similitud en las comunidades microbianas	64-70
OTUs observados	71-74
Dinámica de los géneros microbianos más abundantes en la fermentación del pulque	74-75

Discusión de papel biológicos de los géneros de microorganismos más abundantes	75-78
Discusión	78-79
Conclusiones	80-81
Referencias	82-96
Anexo.....	97-100

Resumen

El pulque es una bebida ancestral que ha sido consumida por poblaciones del altiplano central de México. Existe evidencia histórica que registra la producción y consumo del pulque desde tiempos anteriores a la conquista. Los registros indican que, en las culturas Otomí, Tolteca y Mexica, se producía y consumía el pulque y su importancia era ceremonial y alimenticia. Además del papel cultural que ha tenido el pulque, a éste se le han atribuido características que lo hacen único: fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas. Debido tanto a la riqueza histórica, cultural y como proceso biotecnológico ancestral, se busca obtener la denominación de origen del pulque con el fin de proteger a esta bebida y a su proceso de producción. En el presente trabajo se muestra evidencia histórico-geográfica, fisicoquímica y organoléptica del pulque, la cual sustenta la tramitología para obtener la denominación de origen de esta bebida para la región del altiplano Hidalguense.

Desde el punto de vista histórico-geográfico, existe evidencia que los municipios de Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala pertenecen al área conocida como altiplanicie pulquera, la cual ha sido importante en la producción de pulque en el siglo XX. A su vez esta área pertenece al altiplano central, el cual ha sido reconocido como importante para la producción pulquera desde la época prehispánica. El Códice Florentino registra que los asentamientos de las culturas Mexica, Tolteca y Otomí en dicha zona fueron las primeras en producir pulque. Además, existe evidencia arqueológica descubierta por César Lizardi Ramos en el estado de Hidalgo donde se encontraron raspadores de Agave, los cuales datan del siglo V a.C. Esta evidencia nos muestra que ha existido un legado ancestral en la preparación del pulque y, aunado a los resultados de los estudios organolépticos y fisicoquímicos, se ha registrado que el pulque producido en esta área presenta atributos constantes y que la calidad del pulque producido es de alta calidad (Tipo I con base en la norma NMX-V-037-1972).

Además de tener un papel cultural importante, el pulque presenta características nutrimentales que son de interés biotecnológico y alimenticio. Esta bebida se obtiene de la fermentación de un sustrato llamado aguamiel, la savia de Agave, la etapa media de la fermentación recibe el nombre de contrapunta y al producto final se le nombra pulque. El proceso de fermentación está dado por los microorganismos autóctonos que se encuentran en el aguamiel y son provenientes del ambiente. Estos microorganismos le confieren

características organolépticas específicas, por lo que es importante explorar la diversidad de los mismos, así como su dinámica a través de la fermentación.

Los estudios organolépticos realizados en el presente estudio muestran que el pulque tiene características organolépticas que lo hacen único como son: apariencia burbujeante, brillante y viscosa, con textura burbujeante y viscosa, con olor a agave y nota fermentada sabor ácido, con notas alcohólicas y fermentadas las cuales, al ser comparados con los estudios de Vázquez M *et al.*, 2011 las características se mantienen constantes. Los estudios fisicoquímicos muestran que la calidad del pulque de Hidalgo es del tipo I (es decir el tipo de mayor calidad) con base en la norma de manejo del pulque a granel y sugiere que los datos obtenidos en este estudio pueden servir de base para reajustar dicha norma (NMX-V-037-1972). Con toda la evidencia recabada en este trabajo se busca solicitar la denominación de origen para los municipios de Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala que se encuentran en la región del altiplano perteneciente al estado de Hidalgo.

En el segundo capítulo del presente estudio, se explora la diversidad y dinámica de bacterias y hongos en aguamiel, contrapunta y pulque, mediante técnicas de secuenciación masiva de amplicones. Comparando el número de géneros microbianos observados en este trabajo con los reportados anteriormente (de León *et al.*, 2005; Escalante A *et al.*, 2016; Escalante A *et al.*, 2014; García-Mendoza, 1992; Lappe-Oliveras, 2008; López-Díaz *et al.*, 2001) se observó que nuestro estudio es 3 órdenes de magnitud mayor para géneros bacterianos y 4 para géneros de hongos, resultados de diversidad microbiana sin precedentes para el pulque. La diversidad de bacterias observada en las muestras fue mayor que las de hongos. El número de OTUs (unidades taxonómicas operacionales) fúngicos y bacterianos compartidos entre el aguamiel y el pulque, presentaron la mayor abundancia. El número mayor de OTUs de hongos y de bacterias se observaron en el aguamiel (bacterianos= 3498, fúngicos=1483), seguido del pulque (bacterianos= 2504, fúngicos=87) y finalmente contrapunta (bacterianos=2147, fúngicos=59) con el menor número. Además, se encontraron OTUs durante todo el proceso de fermentación, los cuales a nivel género son identificados como: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Halomicronema*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Marivita*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Weissella*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Clavispora*, *Epicoccum*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*.

Introducción

Definición de Pulque

El pulque es una bebida alcohólica fermentada no destilada con 4-6% de alcohol, la cual se obtiene de la fermentación del tipo láctico-alcohólico-acético de la savia de agave (García-Garibay et al., 2004; García-Mendoza, 1992). Esta bebida ha sido consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central (Cervantes-Contreras, 2008). El consumo y la producción artesanal del pulque tienen un origen prehispánico (Erlwein *et al.*, 2015). Parte del legado cultural prehispánico se hace evidente con las tradiciones que sobre el pulque mencionan antropólogos como Raúl Guerrero Guerrero (Guerrero-Guerrero, 1980). Entre esas tradiciones se menciona que sólo los ancianos y los tlachiqueros (productores de pulque) tenían el privilegio de tomar pulque en cualquier momento; las razones eran distintas, en el caso de los ancianos era por motivos religiosos, por su conocimiento del culto a los dioses y de las tradiciones, mientras que los tlachiqueros tenían que probarlo por ser quienes se dedicaban a producir la bebida y de ellos claramente dependía la calidad del pulque (Erlwein *et al.*, 2015). Además de la importancia social que tiene el pulque, se destaca la importancia económica que tuvo durante el siglo XIX y principios del XX ya que era una de las principales actividades económicas de la región de los llanos de Apan (Erlwein *et al.*, 2015). Otra forma de definirlo con base en sus características se resume como una bebida alcohólica, blanca y espesa, proveniente del altiplano de México, que se obtiene haciendo fermentar el aguamiel de diferentes especies de maguey (Flores M.A et al., 2006). Entre las especies más comunes para la extracción de aguamiel se encuentran *Agave americana*, *A. atrovirens* Keaw, *A. atrovirens var salmiana*, *A. ferox*, *A. mapisaga* Trel, *A. salmiana var angustifolia*, *A. salmiana var ferox* y *A. salmiana var salmiana* siendo la especie *A. salmiana*, la más utilizada de debido a su gran producción de aguamiel (Escalante A *et al.*, 2016; Ulloa & Herrera, 1976). Existen otros usos o características que le han atribuido al aguamiel y al pulque, entre estas se encuentran propiedades como cierta función laxante, además de propiedades prebióticas y probióticas (Escalante A *et al.*, 2016; Vera & Georgina, 1976). En la bibliografía, podemos encontrar estudios científicos destacados en temas relacionados a las características fisicoquímicas del aguamiel obtenido de distintos tipos de agave, el aporte nutrimental del pulque, la diversidad de bacterias y otros microorganismos encontrados en el pulque, la dinámica de poblaciones de *Saccharomyces sp*, *Zymomonas sp* y *Leuconostoc sp* en el aguamiel y tres etapas de fermentación del pulque (semilla, contrapunta, corrida), la cantidad de etanol producido en las distintas etapas y el estudio de la importancia de levaduras en la fermentación del pulque (Cervantes-Contreras, 2008; Escalante A *et al.*, 2004, Escalante A *et al.*, 2012; Escalante A *et al.*, 2016; Estrada-Godina A *et al.*, 2001; León-de la O *et al.*, 2012; Ulloa & Herrera, 1976). Dichos estudios se han realizado con pulque proveniente de Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y la Ciudad de México (Cervantes-Contreras,

2008; Escalante A *et al.*, 2004, Escalante A *et al.*, 2012; Escalante A *et al.*, 2016; Estrada-Godina A *et al.*, 2001; León-de la O *et al.*, 2012; Ulloa & Herrera, 1976).

Proceso de producción

El pulque se produce de forma artesanal e industrial, el artesanal generalmente se consume de forma local a diferencia del industrial, ya que el último es enlatado y generalmente exportado (Loyola-Montemayor, 1956). Ambos procesos de producción requieren de los azúcares de agave contenidos en el aguamiel. El aguamiel es resultado de un proceso largo, el cual inicia cuando la planta de agave tiene una edad aproximada de entre 8 y 12 años, en esta edad el agave está en la etapa adulta y es en esa etapa del desarrollo cuando se le remueve de manera mecánica el tallo meristemo floral apical o quiote, a este proceso se le conoce como castración o capado (A Figura 1) (Macedo E, 1950). El capado se realiza antes de que el agave utilice los azúcares para producir las inflorescencias. Al evitar dicho proceso, los azúcares quedan disponibles en la piña de la planta para ser extraídos en forma de aguamiel (Lappe-Oliveras, 2008). Una vez cortado el quiote, se hace un cajete o hueco el cual puede verse como un orificio en el centro del agave y es aquí donde se almacenará la savia de la planta (Figura 1-B) (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016). Posterior al capado y a la construcción del cajete, este se cubre con pencas que fueron cortadas y otros elementos (Figura 1-C) y se deja añejando algunos meses (entre 3 y 6) (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016). Una vez que la planta tiene meses añejando se quitan las pencas exponiendo el cajete, y se realiza un raspado dentro del mismo para romper los haces vasculares y estimular la producción constante de aguamiel (Figura 1-D) (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016). El proceso de raspado puede realizarse dos veces al día y la producción de aguamiel por raspado oscila entre 1 a 3 L dependiendo del tipo y tamaño del agave (Figura 2-A). La extracción del aguamiel se realiza utilizando un artefacto llamado acocote (Figura 2-B), el cual es una calabaza seca la cual sirve como extractor por succión, es decir al succionar por la parte superior sube el aguamiel y queda contenida en el cuerpo del acocote para posteriormente ser colocado en contenedores para su transporte (Figura 2-C) (Loyola-Montemayor, 1956).

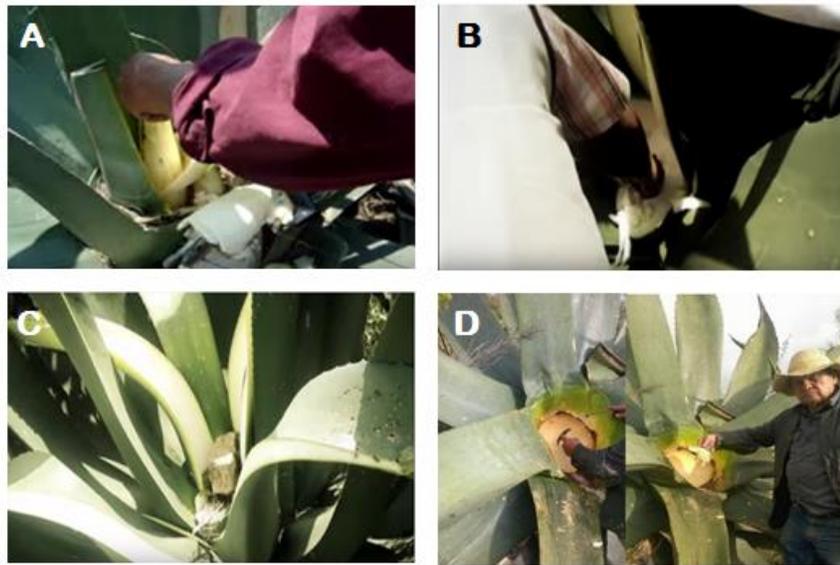


Figura 1- Preparación del agave previo a la extracción de aguamiel. **A-** Capado del agave, **B-** Construcción del cajete, **C-** Añejamiento del cajete, **D-** Raspado del cajete y obtención del aguamiel. A: tomada de Parasonare Bowls, 2011; B y C: tomadas de Ivan Linch, 2015; D: proporcionada de Mario Islas.



Figura 2- Recolección del aguamiel. **A-** Producción matutina de aguamiel matutina, **B-** forma clásica de extracción de aguamiel utilizando un acocote (calabaza seca), **C-** Colecta del aguamiel al recipiente plástico. A, B y C: proporcionadas por Mario Islas.

A continuación, se resume el proceso de extracción de aguamiel, proceso que es compartido en la producción artesanal e industrial.

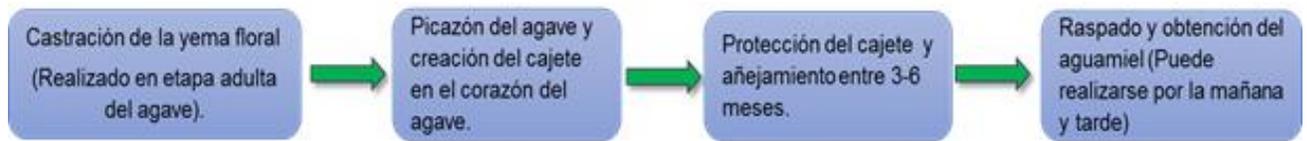


Figura 3-Diagrama de flujo que muestra el proceso de colecta de aguamiel.

Producción artesanal

La producción artesanal del pulque requiere de un conocimiento ancestral proveniente desde épocas prehispánicas. Dicho conocimiento es aplicado por los tlachiqueros, nombre que reciben las personas que se encargan de producir el pulque, los tlachiqueros, la forma tradicional de producir el pulque y la cultura pulquera del siglo XIX han sido elementos clave para que esta tradición sea reconocida como identidad cultural mexicana (Erlwein *et al.*, 2015).

La producción artesanal puede realizarse *de novo* o alimentando tinas de fermentación. Para producir pulque *de novo* se requiere de “semilla” y aguamiel como materias primas. La semilla puede ser definida como pulque maduro o pulque madre, el cual contiene microorganismos autóctonos que llevan a cabo la fermentación (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016; García-Garibay *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004). Para producir el pulque *de novo* debe agregarse una proporción aproximada de 2 L de semilla por cada 20 L de aguamiel y se deja fermentar entre 24 y 48 horas para obtener el pulque (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016; Erlwein *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2004). En la producción por alimentación en las tinas de fermentación sólo se requiere de la extracción de pulque y la adición constante de aguamiel aproximadamente cada 24hrs, es decir, se extrae pulque para volver a alimentar el sistema de fermentación (Figura 4) (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016; García-Garibay *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004). Durante el proceso de fermentación se llega a una etapa llamada contrapunta la cual se define como la etapa media de la fermentación, la contrapunta sigue fermentando y en un plazo entre 24-48 horas hasta que se obtiene el pulque (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016; García-Garibay *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004). El pulque es un producto de corta duración ya que si no se mantiene en condiciones de frío su actividad fermentativa continúa y si pasa mucho tiempo puede seguir fermentando hasta convertirse en vinagre (Lappe-Oliveras, 2008; Escalante A *et al.*, 2016; García-Garibay *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004).

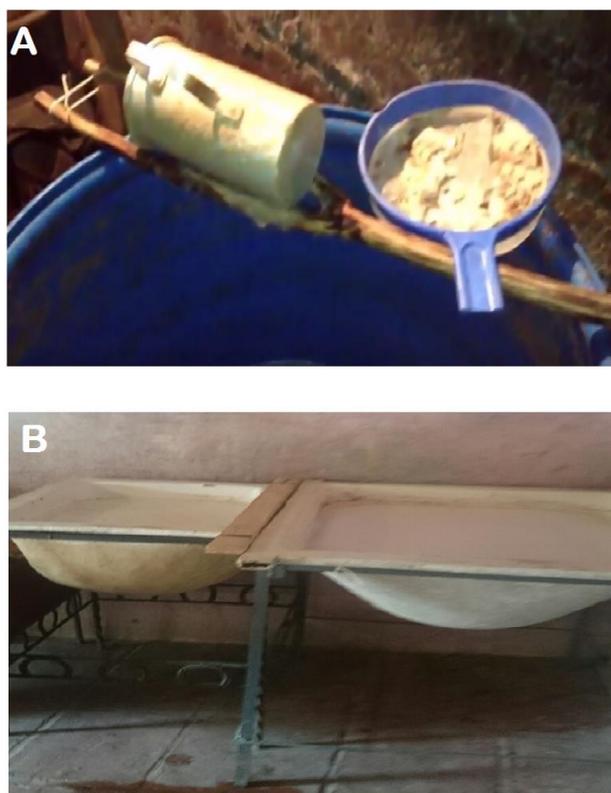


Figura 4- Proceso artesanal de producción por alimentación en tinajas de fermentación. **A-**Filtrado de aguamiel en tinajas de fermentación, **B-**Tinajas de fermentación. **A:** tomada de Pepito Griya, 2013; **B:** proporcionada por Mario Islas.

Producción industrial

Al igual que la forma tradicional, la producción industrial del pulque requiere del aguamiel para poder producirlo. El aguamiel es previamente obtenido como se describe en la producción de pulque artesanal antes mencionada. Una vez que se tiene la materia prima entra al área de recepción y colado, se evalúa la calidad con base en los estándares de las normas de manejo a granel del pulque y se clasifica en aguamiel de baja calidad (aguamiel tipo 2) y alta calidad (aguamiel tipo 1) (DOF, 1972a). El aguamiel de baja calidad debe pasar a por 4 tinajas de fermentación por un plazo aproximado de 36 horas, mientras que el pulque de alta calidad sólo es colocado en una tina de fermentación y el proceso de fermentación de este pulque es de aproximadamente 24 horas (García-Garibay *et al.*, 2004; Loyola-Montemayor, 1956). Posterior al proceso de fermentación se obtiene el pulque el cual podrá ser comercializado en tres tipos, manejo a granel, curados y enlatados (García-Garibay *et al.*, 2004; Loyola-Montemayor, 1956). El pulque que es para manejo a granel y para preparar curados no requiere de la adición de aditivos por lo que es de venta directa (García-Garibay

et al., 2004; Loyola-Montemayor, 1956). La mayor parte del pulque que se produce de forma industrial es enlatado (García-Garibay et al., 2004; Loyola-Montemayor, 1956). Para el proceso de enlatado el pulque debe ser mezclado con conservadores, coloides y antióxidantes, después de agregar los anteriores, precalentar la mezcla, se enlata, se deja enfriar, secar y posteriormente es etiquetado (García-Garibay et al., 2004; Loyola-Montemayor, 1956).

En el siguiente diagrama se resume el proceso de producción artesanal e industrial del pulque:

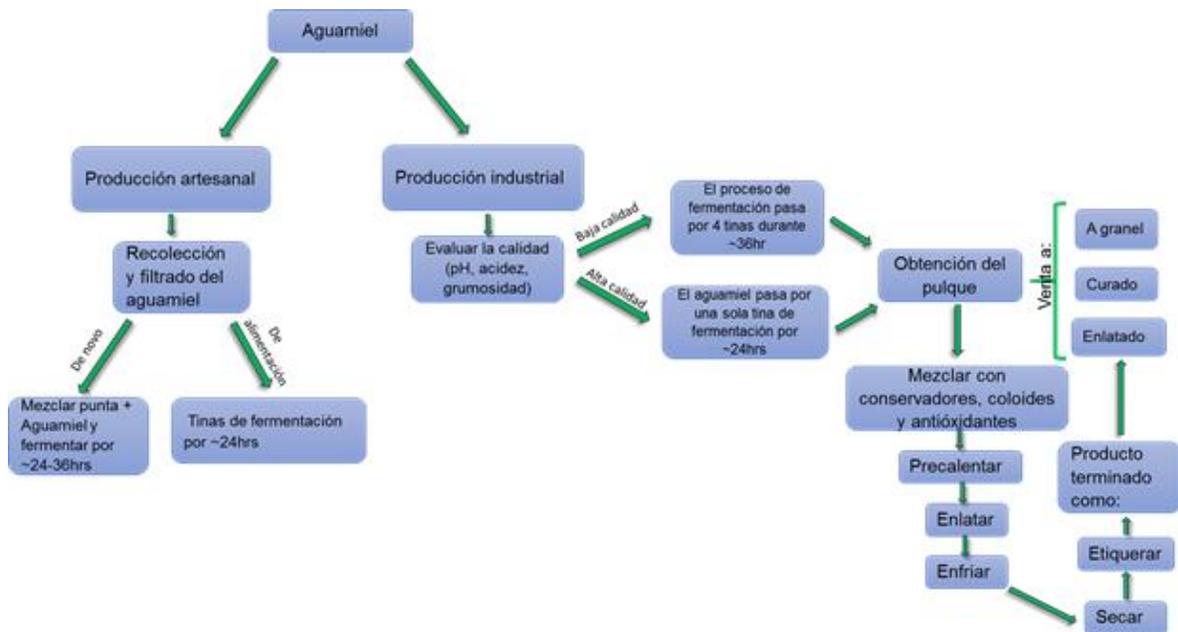


Figura 5- Diagrama que resume el proceso de producción artesanal e industrial partiendo desde la recepción del aguamiel.

Capítulo I *“Trabajo técnico justificativo para promover la denominación de origen del pulque: caso Hidalgo”*

Antecedentes

Denominación de Origen

La denominación de origen es un signo distintivo con el cual se reconoce un producto característico de una región dado sus características (IMPI, 2016). La calidad de dicho producto se debe al medio geográfico, es decir, a los factores naturales: el clima, el suelo, los minerales y el agua, y al factor humano que conoce y lleva a cabo su elaboración (OMPI, 1958). Este signo distintivo puede reconocerse a nivel mundial y es respetado por los países que conforman el Arreglo de Lisboa (OMPI, 1958). Dicho arreglo protege la pertenencia de un producto a un país respetando y aceptando la producción sólo en dicho país. El arreglo de Lisboa está conformado por 27 países los cuales son Argelia, Bulgaria, Burkina Faso, Congo, Costa Rica, Cuba, Eslovaquia, España, Francia, Gabón, Georgia, Grecia, Haití, Hungría, República Islámica de Irán, Israel, Italia, Marruecos, **México**, Montenegro, Nicaragua, Perú, Portugal, República Checa, República de Moldova, República Popular Democrática de Corea, Rumania, Togo, Túnez y Turquía (OMPI, 1958). México forma parte de ese arreglo y tiene hasta la fecha 15 denominaciones (Tabla 1), pero a diferencia de algunas regiones como la Unión Europea (6021 denominaciones) y Estados Unidos (910 denominaciones) está muy por debajo en el número de denominaciones que tiene a pesar de la gran diversidad de productos con las que cuenta este país (Giovannucci et al., 2009). México es un país megadiverso que tiene productos que tienen potencial para obtener denominación de origen (CONABIO, 2013). Entre esos productos que tienen potencial para obtener la denominación se encuentra el pulque.

Producto	Descripción	Región
Tequila	Bebida alcohólica destilada de agave llamada Tequila	Jalisco, Nayarit, Tamaulipas, Michoacán, Guanajuato
Mezcal	Bebida alcohólica destilada de maguey denominada Mezcal	Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Oaxaca, Tamaulipas, Michoacán, Guanajuato y Puebla
Bacanora	Bebida alcohólica regional del estado de Sonora	Sonora
Sotol	Bebida alcohólica destilada de maguey llamada sotol	Chihuahua, Coahuila y Durango

Charanda	Bebida alcohólica, obtenida de la fermentación y destilación del jugo de la caña de azúcar	
Olinalá	Artesanía de madera que se manufactura con materia prima del municipio de Olinalá	Guerrero
Talavera	Loza artesanal de Talavera	Puebla y Tlaxcala
Ambar de Chiapas	Ambar per se cómo piedra semipreciosa de origen vegetal, así como los productos elaborados con ese material	Chiapas
Café Veracruz	Café verde o tostado	Veracruz
Café de Chiapas	Café verde o tostado molido de la especie <i>coffea arabica</i> , perteneciente a la familia de las rubiáceas	Regiones de chiapas
Mango Ataúlfo	Mango	Municipios chiapanecos de Suchiate
Vainilla de Papantla	Fruto maduro beneficiado de la orquídea <i>Vanilla planifolia</i> Andrews, sus extractos y derivados.	Veracruz y Puebla
Chile Habanero de la península de Yucatán	Chile habanero fresco, en estado inmaduro o maduro, encurtido, en pasta, deshidratado, entero, en polvo y en salsas.	Campeche, Quintana Roo y Yucatán
Arroz del Estado de Morelos	Arroz palay, integral o moreno y pulido y subproductos del arroz.	Morelos

Tabla 1- Denominaciones de Origen que tiene México hasta el 2016. Basada en información del libro: “Orgullo de México” (IMPI, 2016).

Proceso para solicitar la denominación de Origen

La solicitud para una denominación de origen está regida por un marco legal que tiene lineamientos específicos a seguir, este marco legal está escrito en la Ley de Propiedad Intelectual (LPI). El proceso para la solicitud de denominación de origen se resume a continuación:

1-El Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) puede emitir una declaración con base en el trabajo de investigación que se puede plasmar como un oficio, compendio de investigación por un representante que demuestre tener interés jurídico para solicitar una denominación de origen, esto realizando un documento el cual tenga el formato del artículo 159 (Figura 6).

Artículo 159

La solicitud de la declaración de protección de una denominación de origen se hará por escrito a la que se acompañaran los comprobantes que funden la petición y en la que expresará lo siguiente:

I.- Nombre, domicilio y nacionalidad del solicitante. Si es persona moral deberá señalar, además, su naturaleza y las actividades a que se dedica;

II.- Interés jurídico del solicitante;

III.- Señalamiento de la denominación de origen;

IV. Descripción detallada del producto o los productos terminados que abarcará la denominación, incluyendo sus características, componentes, forma de extracción y procesos de producción o elaboración. Cuando sea determinante para establecer la relación entre la denominación y el producto, se señalarán las normas oficiales establecidas por la Secretaría de Economía a que deberán sujetarse el producto, su forma de extracción, sus procesos de elaboración o producción y sus modos de empaque, embalaje o embasamiento;

V.- Lugar o lugares de extracción, producción o elaboración del producto que se trate de proteger con la denominación de origen

Figura 6- **Contenido del artículo 159 de la Ley de Propiedad Industrial.**

2- Desarrollar el punto IV del documento 159 a detalle mediante la evidencia encontrada, esto podría ser mediante la creación de un documento Anexo.

3- Presentar ante el IMPI la evidencia encontrada y plasmada en un posible documento anexo y el documento con el contenido del artículo 159 para someter los documentos a revisión, proceso que se resume en la Figura 7.

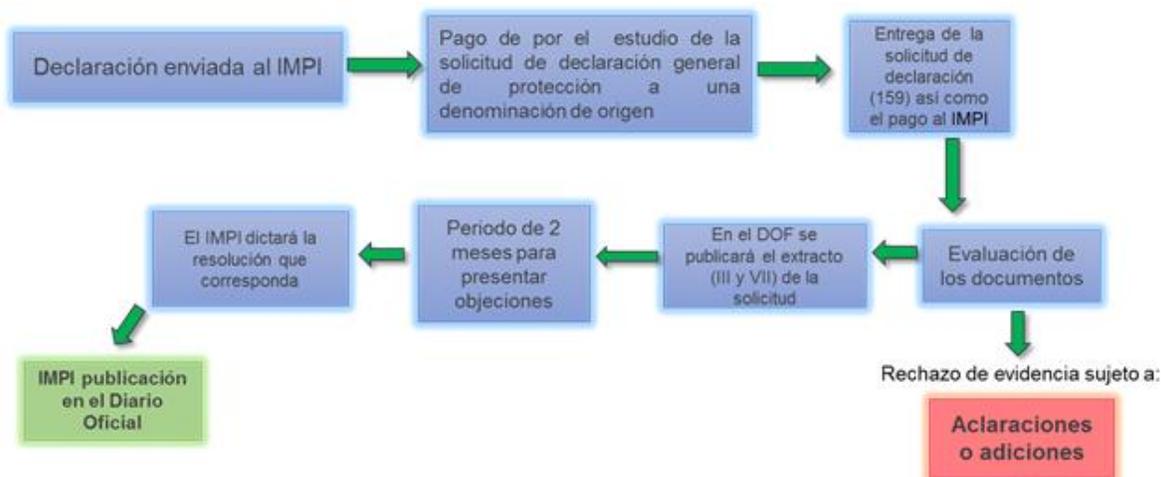


Figura 7 - Proceso de solicitud de una denominación de origen ante el IMPI. Basado en la Ley de propiedad Intelectual.

Características fisicoquímicas del aguamiel y pulque basados en las normas de calidad NMX-V-022-1972 y NMX-V-037-1972

Los estudios de aguamiel y pulque se han realizado desde el siglo XX, y desde entonces se encuentra un número mayor de estudios de aguamiel que de pulque (León-de la O *et al.*, 2012). En la norma NMX-V-037-1972 se plantea que las características del pulque pueden ser proporcionadas por el tipo de aguamiel con la que se produce, lo que deja en claro la importancia del estudio del aguamiel (DOF, 1972a). Se tiene registro de algunas características fisicoquímicas en el libro “El pulque. Estudio científico” de Francisco Bulnes publicado en 1909 en el cual mostraba las características fisicoquímicas del pulque (Tabla 2) acorde a las técnicas de la época, de las cuales hoy en día algunas son obsoletas (Bulnes, 1909). Datos más recientes son presentados por el instituto de nutrición Tabla 3 y otros más por Israel León Tabla 4, estos muestran algunas características fisicoquímicas reportadas por su estudio y otras encontradas en la literatura (Badillo, 2013; León-de la O *et al.*, 2012).

Composición del pulque	
Componente	(%)
Alcohol etílico	3.72
Azúcares superiores	0.0
Materias azoadas	0.81
Materias gomosas	4.02
Azúcar sin fermentar	1.80
Materias minerales	0.64
Glicerina	0.09
Ácidos libres	0.18
Agua	88.74

Tabla 2- Composición química del pulque. Tomada de: Bulnes., 1909.

Componente	g(%)
Agua	94.0
Proteína	0.34
Glúcidos	0.50
Gomas	0.66
Etanol	3.68
Cenizas	0.20
Glicéridos	0.0
Sacarosa	0.03
Azúcares reductores	0.02

Tabla 3- Composición química del pulque. Tomada de: Instituto de nutrición.

Determinación	Valores obtenidos por Colín Méndez	Valores encontrados en la literatura
Humedad	98%	97%
Cenizas	0.5%±0.1	0.3%
Grasas	0g	0g
Nitrógeno total	0.31g/100ml ± 0.05	0.14-0.37 g/100ml
Fibra	0g/L	0g/L
Carbohidratos totales	3.5g/100mL ± 2	3.0-6.2 g/100mL ± 2
Etanol	6% ± 2	5-10%
Calorías	40.8Kcal/100mL	42.5 Kcal/100mL

Tabla 4- Características fisicoquímicas y bromatológicas del pulque. Tomada de León-de la O *et al.*, 2012.

La composición fisicoquímica del aguamiel ha sido estudiada desde los 1800. En el año de 1858 de forma exploratoria (Flores *et al.*, 2006), posteriormente en el año de 1976 los estudios realizados por Vera & Georgina (1976) dieron a conocer una composición más reciente de los constituyentes del aguamiel y algunas características fisicoquímicas (Vera & Georgina., 1976). Finalmente, se puede

comparar con los resultados de la composición fisicoquímica del pulque obtenidos por Flores y colaboradores (Flores *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 1996) (Tabla 5).

Componentes	Aguamiel
Volumen (ml)	1200
Humedad (%)	95
Cenizas (g)	1.3
pH	4.8
°Brix	15.3
Índice de refracción	1.3
Densidad (g .L ⁻¹)	1.07
Viscosidad (g .L ⁻¹)	0.6
Proteínas(mg .L ⁻¹)	2.9
Azúcares totales (g .L ⁻¹)	3.2
Azúcares reductores (g .L ⁻¹)	2.8
Glucosa(mg .L ⁻¹)	2.3
Fructosa(mg .L ⁻¹)	8.7

Tabla 5- Características fisicoquímicas del aguamiel. Tomada de: Flores *et al.*, 1996.

En 2012, Hernández-Ramos & Torres estudiaron las características fisicoquímicas del aguamiel (Tabla 6). Dichos estudios fisicoquímicos del aguamiel muestran diferencias significativas en pH, grados Brix, proteínas, azúcares totales y contenido de cenizas. Debido a esas variaciones Flores *et al.*, 2006 decidieron comparar las características fisicoquímicas en tres variedades de agave (manzo, cenizo y amarillo) así como su productividad (Tabla 7).

Parámetro	Unidades	Cantidad
pH		6.30
Densidad a 20°C	g/cm ³	1.023
Grados Brix		8.00
Índice de refracción 20°C		1.355
Azúcares totales	g/100mL	7.370
Azucars reductores directos	g/100mL	2.400

Gomas	g/100mL	0.580
Proteínas	g/100mL	1.08
Sólidos totales	g/100mL	7.210
Cenizas	g/100mL	0.280
Calcio	mg/100mL	10
Fósforo	mg/100mL	20
Hierro	mg/100mL	0.40
Tiamina	mg/100mL	0.10
Niacina	mg/100mL	0.50
Ácido ascórbico	mg/100mL	11.03

Tabla 6- Características fisicoquímicas del aguamiel. Tomada de: Hernández-Ramos & Torres, 2012.

Componentes de aguamiel	Variedades		
	Manzo	Cenizo	Amarillo
Densidad (g*L ⁻¹)	1.298	1.268	12.31
pH	6.3	6.4	6.6
Índice de refracción	1.352	1.353	1.365
Sólidos solubles (°Brix)	11.44	11.01	12.67
Acidez (%)	1.65	1.41	1.47
Humedad (%)	87.0	87.9	86.0
Proteínas (g*L ⁻¹)	3.41	3.11	2.49
Cenizas (g)	0.534	0.413	0.480
Azúcares reductores (g*L ⁻¹)	1.637	1.973	1.069
Glucosa (mg*L ⁻¹)	2.310	3.12	2.5
Fructosa (mg*L ⁻¹)	4.703	4.928	4.5

Tabla 7- Características fisicoquímicas del aguamiel en tres variedades diferentes. Tomada de: Flores *et al.*, 2006.

Los valores de las características fisicoquímicas en las tres variedades no difieren significativamente como lo demuestra Flores *et al* 2006 en su estudio. donde se concluye que el tipo de agave no es un factor determinante en las características del aguamiel que se obtiene, sino que las diferencias están dadas por el manejo y los factores ambientales (Flores *et al.*, 2006). La conclusión anterior es apoyada por la evidencia que muestra el trabajo de tesis de Abril Ramírez en 2010 en el cual se comparan los estudios de Flores *et al* 2006, donde las tres variedades de agave provenían de la misma región (Tlaxcala) mientras que los estudios de Abril Ramírez se trataban de otra variedad proveniente del Estado de México (Ramírez, 2010). En la Tabla 8, derivada del trabajo de Abril Ramírez se puede apreciar que los datos de muestras provenientes del mismo estado presentan poca variación, en cambio si se comparan con los del Estado de México las diferencias se hacen sumamente evidentes. Como anteriormente se mencionó, dichas características están determinadas por el ambiente donde crecen los agaves por lo que los valores numéricos de los estudios fisicoquímicos son muy diversos (García-Garibay *et al.*, 2004; Loyola-Montemayor, 1956; Ramírez *et al.*, 2004; Escalante A *et al.*, 2016). Dependiendo del uso del aguamiel y el pulque dichos valores deben entrar en los parámetros establecidos en las normas mexicanas (NMX-V-022-1972 y NMX-V-037-1972) en dichas normas se muestra una clasificación del pulque y aguamiel respectivamente (DOF, 1972a, DOF, 1972b). El pulque y el aguamiel se clasifican en tipo I y tipo II, esta clasificación está dada por las características fisicoquímicas que presenta la muestra, las características que debe cumplir el pulque o aguamiel para considerarse en uno de los dos tipos está dado por un rango de valores de las características fisicoquímicas que se muestran en la (Tabla 9).

Componentes de aguamiel	Tlaxcala			Estado de México
	Manzo	Cenizo	Amarillo	<i>A. Salmiana</i>
Densidad (g*L ⁻¹)	1.298	1.268	12.31	1.112
pH	6.300	6.400	6.600	6.845
Índice de refracción	1.352	1.353	1.365	1.349
Sólidos solubles (°Brix)	11.44	11.01	12.67	22.00
Acidez (%)	1.650	1.41	1.47	1.567
Humedad (%)	87.000	87.9	86.0	87.400
Proteínas (g*L ⁻¹)	3.410	3.11	2.49	3.323
Cenizas (g)	0.534	0.413	0.480	0.419

Azúcares reductores (g/L)	8.650	10.021	8.069	32.130
---------------------------	-------	--------	-------	--------

Tabla 8- Características fisicoquímicas de aguamiel proveniente de diferentes especies y estados. Basada en datos de Ramírez, 2010.

Especificaciones	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
pH	>3.7	4.2	3.3	4
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100ml	0.4	0.75	0.4	0.7
Acidez	0.9	1.03		4

Tabla 9- Valores de las características fisicoquímicas empleados para determinar el tipo de aguamiel. Tomada de: DOF, 1972b

Características organolépticas del pulque

Los estudios organolépticos permiten definir las características de apariencia, color, olor y sabor de un producto (Rivas-Hilario, 2014). Las características pueden estar influenciadas por otros factores como ambiente, manejo, variaciones locales en las técnicas de producción etc. Debido a ello existen algunas variaciones en los perfiles sensoriales del pulque, pero algunos atributos de apariencia, olor, sabor y textura son conservados (Saint-Eve *et al.*, 2011).

Existen trabajos donde se evalúa el perfil organoléptico de pulque, uno de dichos trabajos es el de Catalina Rivas Hilario (2014). Dicho trabajo en letras de su autora tenía el objetivo de “...conocer las características sensoriales más importantes que se generan en la bebida denominada pulque. Ya que los estudios sensoriales existentes son poco detallados” (Rivas-Hilario, 2014). En dicho estudio se evaluó pulque comercial, pulque elaborado en laboratorio y pulque artesanal, el último proveniente de Hidalgo, Estado de México y pulquerías de la Ciudad de México. El estudio reveló que la apariencia del pulque presenta burbujas, brillo, grumosidad, el olor del pulque presenta nota fermentada, alcohólica y olor a agave, y madera. Con respecto al sabor, presenta nota a fermentada, ácida, aguamiel y frescura, la textura definida por uniformidad y viscosidad atributos que en algún tipo de pulque aparecían más evidentes que en otros, pero eran compartidos por el pulque comercial, el elaborado en laboratorio y el artesanal. Además, el estudio de Rivas-Hilario (2014), centra sus objetivos específicos en definir los atributos sensoriales que tipifican al pulque, mediante un análisis descriptivo y cuantitativo creando así un cuestionario con atributos de apariencia, textura, olor y sabor

que son representativos para dicha bebida (Rivas-Hilario, 2014). En un inicio el estudio de Rivas-Hilario (2014) consistió en evaluar distintas características en el pulque, en el cual se evaluaban diversos atributos como color, apariencia, olor, textura y sabor inicialmente cada atributo presenta distintas características y una escala para evaluar los atributos que iba del 0-10, mediante un cuestionario. El cuestionario final sufrió algunos ajustes sugeridos por los jueces dando como resultado un cuestionario con una escala del 1-9 para evaluar los atributos. Las características presentes en el cuestionario tienen menos atributos, tales atributos fueron seleccionados con base en un análisis de componentes principales.

Actualmente para el manejo del pulque y aguamiel existen normas, las cuales contienen conceptos y valores de las características organolépticas y fisicoquímicas para su clasificación (DOF, 1972a, DOF, 1972b). La norma NMX-V-037-1972 para el manejo del pulque y NMX-V-022-1972 para el manejo del aguamiel (DOF, 1972a, DOF, 1972b). Para el pulque las características organolépticas están definidas por 3 atributos los cuales son color, sabor y olor (DOF, 1972b). El color descrito en las normas debe ser blanco, respecto al sabor y olor se define como suigéneris sin presentar olores diferentes o impropios. Respecto al aguamiel se evalúan 4 aspectos que son color, olor, sabor y aspecto. El color del aguamiel con base en las normas, debe ser ligeramente ámbar, presentar el olor característico del producto mientras que el sabor que presenta debe ser dulce, suigéneris, el aspecto general del pulque debe ser traslúcido.

Antecedentes Histórico-geográficos de producción de pulque

Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala son municipios que pertenecen a los Llanos de Apan, una región conocida históricamente porque ha sido sumamente importante en el auge del pulque, ya que aquí se encontraban haciendas pulqueras de las cuales quedan activas muy pocas (Figura 8) (Aviña, 2010; Monterrubio, 2007). Esta región abarca municipios de Hidalgo, Tlaxcala y algunas porciones del estado de México. Los municipios hidalguenses que comprende la región son Mineral de la Reforma, Epazoyucan, Zempoala, Tlanalapa, Tepeapulco, Apan, Emiliano Zapata, Almoloya, Singuilucan y parte de Tulancingo y Cuauhtepic (Monterrubio, 2007). Las condiciones climáticas y geográficas de la región favorecieron el auge del cultivo del maguey pulquero (Gentry, 1982; Macedo, 1950). Las especies de agave más comunes que crecen en estas tierras están representadas por el *Agave Salmiana* (CONABIO, 2013). El relieve de esta zona está representado por un eje neovolcánico. Esta región se encuentra entre 2000 y 3000 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2014). La determinación geográfica se debe más a los hábitos productivos de antaño en torno al maguey como agroindustria, la cual se llevó a cabo en las llamadas haciendas pulqueras. Sin embargo, la producción de pulque en la región ha sido registrada desde la época prehispánica, en la cual habitaban pueblos teotihuacanos, toltecas, mexicas y otomíes, los cuales en su sistema

de creencias tenían veneración a los dioses relacionados con el maguey, la fertilidad y la embriaguez (Guerrero-Bustamante, 2016). Desde esos tiempos, se ha registrado que la zona más propicia para el desarrollo de las especies productoras del pulque ha sido el Altiplano Central de México (Aviña, 2010; Gentry, 1982; Guerrero-Bustamante, 2016).

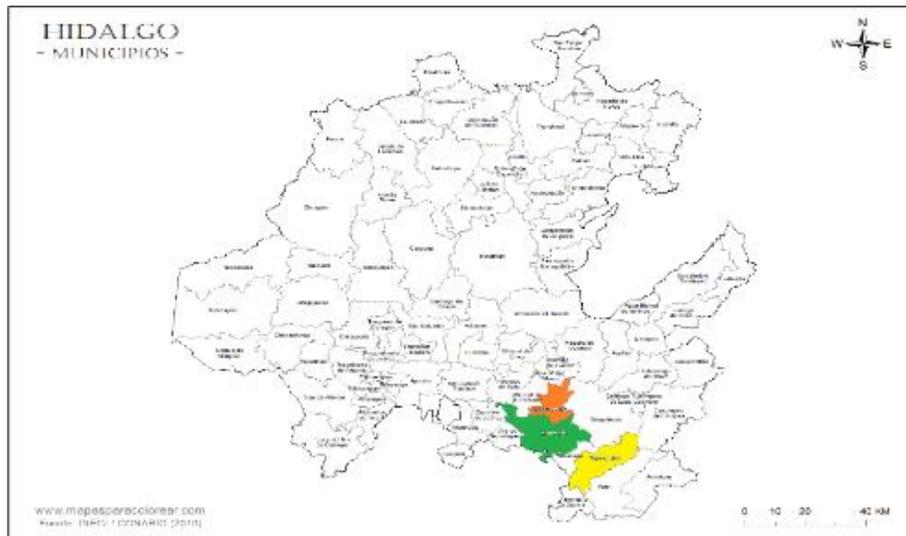


Figura 8- Municipios de Hidalgo promovidos para obtener la denominación de origen Epazoyucan (naranja), Zempoala (verde), Tepeapulco (amarillo).

Desde veinte años antes de cristo, el maguey ha sido importante en la historia cultural de los habitantes de Mesoamérica ya que maguey fue una de las primeras plantas cultivadas en América media (Monterrubio, 2007). Con el agave en el México antiguo se consumía la bebida fermentada de aguamiel del maguey, la cual fue llamada octli, en náhuatl, y seí, en otomí (Monterrubio, 2007). En la mitología mexicana existen dos versiones sobre su origen: una señala que la diosa Mayahuel descubrió el aguamiel y Pachtécatl o Pantécatl, uno de los 400 dioses de los borrachos, descubrió su proceso de fermentación que más tarde Tepoztécatl, Cuatlapanqui, Tlihua y Papaztac perfeccionaron y posteriormente le llamaron el “vino de la tierra”. La segunda versión afirma que bajo el reinado de Tecpancaltzin (990-1042 d C.), un noble llamado Papantzín descubrió la manera de extraer el aguamiel y regaló al monarca un jarro de miel prieta de maguey (Monterrubio, 2007). La primera versión también involucra a Patecatl quien era el esposo de Mayahuel ya que se dice que él descubrió la mejora de la fermentación de la bebida mediante el uso de yerbas tlapatlí (Monterrubio, 2007). La Pantécatl, Tepoztécatl, Cuatlapanqui, Tlihua, Papaztac y Mayahuel fueron divinizados, a la última se le representó como una mujer que emergió de un maguey con una nariguera de turquesa en forma de luna y bandas rojas sobre la frente y bajo la boca y hoy en día se le conoce como la diosa del maguey (Figura 9-A) (Monterrubio, 2007). Dichos dioses, están representados en los códices Magliabecchiano y en el del Museo de América. Las evidencias arqueológicas señalan que

es una tradición más antigua que la registrada en el siglo VI a C. El arqueólogo César Lizardi Ramos descubrió raspadores de maguey datados hacia el siglo V a C., correspondientes al Preclásico Superior, en la zona arqueológica de Huapalcalco, Hgo (Monterrubio, 2007).

En el México prehispánico existía el pulque (octli o poliui) también conocida como la bebida de dioses (teoctli). Esta ha sido indispensable en diferentes rituales sagrados y algunos juegos, todo ello basado en evidencias que datan de hace 6000 años y marca la transición del nomadismo al sedentarismo. Con dichas prácticas se forjó un sistema de creencias en donde intervenían muchos dioses, una de las deidades más conocida es Mayahuel, la diosa del maguey, a quien los antiguos habitantes de Anáhuac cantaban, rezaban, danzaban y hacían ofrendas (Vela, 2014). En aquella época el pulque era una bebida de consumo ritual que estaba limitada únicamente a los sacerdotes y ancianos, y se castigaba al resto de la población que lo bebiera (Monterrubio, 2007). Únicamente durante una fiesta que se llevaba a cabo cada cuatro años llamada pillahuano, “fiesta donde los niños y niñas beben el vino o pulque”, se autorizaba a toda la población su consumo (Guerrero-Guerrero, 1980; Monterrubio, 2007). La restricción del consumo del pulque en la época prehispánica, que llegaba a la pena de muerte a quienes violaran la norma, se rompió con la conquista española (Figura 9-B) (Monterrubio, 2007).



Figura 9- Representación gráfica de la tradición prehispánica. A-Diosa Mayahuel, B-Ceremonia religiosa con pulque. Tomada de: Guerrero Bustamante., 2016.

La etapa dorada para el pulque fue el Porfiriato, en esta etapa la economía estaba dividida en dos grandes sectores, uno de ellos la minería, la cual se había consolidado a mediados del siglo XIX y el otro el dinero generado por el consumo del pulque y las grandes cantidades de dinero aportado por el pulque en impuestos a la hacienda pública (Guerrero-Bustamante, 2016). Es también importante resaltar que había un gran número de expendios de pulque en la mayoría de las ciudades

mexicanas, o al menos en el centro del país (Guerrero-Bustamante, 2016). En la región del centro del país existe un área de gran relevancia, esta área es llamada los Llanos de Apan, aquí se encontraba el mayor número de haciendas pulqueras activas las cuales abastecían mayormente a la Ciudad de México y alrededores (Guerrero-Bustamante, 2016). El pulque de la región del Altiplano obtuvo gran fama y reputación debido a su calidad y al manejo; su manejo era por medio de un sistema bien administrado: Se realizaba el raspado del maguey, se sacaba el aguamiel, se llevaba al tinacal, se le pagaba al tlachiquero, el pulque se fermentaba en el tinacal y se envasaba en barriles, de ahí se embarcaban en el tren y éste llegaba a la aduana en la Ciudad de México, en donde se evaluaba la calidad y los grados de alcohol, se pagaban los impuestos y llegaba a las pulquerías; ya en ese lugar se consumía o se adquiría para ser llevado lo mismo a una mesa sofisticada o de aristócratas como a las mesas más humildes o a los lugares de trabajo (Guerrero-Bustamante, 2016). Debido a la importancia del pulque en nuestra cultura fue creada la Compañía Expendedora de Pulques a finales del siglo XIX, la cual representa la creación de un gobierno corporativo que agrupó a una buena cantidad de empresarios pulqueros asociados para dar abasto de pulque a la ciudad de México y que sirvió para evitar una competencia desleal y en contraste alcanzar una buena retribución, la cual con la operación de la empresa quedaba asegurada y había beneficios administrativos (Guerrero-Bustamante, 2016; Monterrubio, 2007) .

Algunos historiadores, como Raúl Guerrero Bustamante, mencionan que como erróneamente algunas personas mencionan la cultura del agave y producción del pulque está desapareciendo, a pesar de ya no prevalecer en el altiplano pulquero, las culturas indígenas del México profundo resisten también en su defensa del maguey y nos dan un buen ejemplo, hasta la fecha los otomíes-hñahñú del Mezquital, los mazahuas, matlazincas, purépechas, nahuas entre otras culturas tienen danzas que siguen siendo agradecimientos a los dioses del maguey, aún existe la música que se hace con esas cornetas hechas de quiote hueco, algo así como lo que vemos en los murales de los templos de Bonampak, igualmente prevalecen danzas de xitás en Querétaro, Hidalgo y el Estado de México, en donde las máscaras se elaboran de penca o de corazón de maguey y fibras de ixtle (Guerrero-Bustamante, 2016). Además de estas culturas indígenas que siguen defendiendo la cultura del pulque es importante recalcar que esta cultura pulquera fue enriquecida por cada persona que fue partícipe y cada persona que la mantiene viva hoy en día y cabe destacar el gran aporte que brindaron artistas mexicanos como Diego Rivera y extranjeros como Jean Charlot quienes con su expresión mediante el arte transmitieron esa admiración y respeto a la cultura pulquera, cultura a la que ellos pertenecieron (Guerrero-Bustamante, 2016; Monterrubio, 2007). Además de artistas dentro de esa cultura podemos encontrar a políticos, religiosos y científicos los cuales aportaron de diferente forma.

Justificación

El pulque es una bebida fermentada que ha existido desde tiempos prehispánicos, la cual representa un legado cultural, histórico y biotecnológico. Debido a su importancia como legado cultural y a su papel en el México antiguo y el presente, es necesario proteger al pulque y reconocerlo como propio de México, esto mediante una denominación de origen.

Hipótesis

El pulque es una bebida que, dado a sus importantes características fisicoquímicas, organolépticas e histórico geográficas, tiene potencial para obtener la denominación de origen.

Objetivo general

Desarrollar un documento con evidencia de investigación técnica, científica, legal e histórica que permita solicitar la denominación de origen del Pulque para la región del altiplano hidalguense.

Objetivos particulares

- Investigar los requerimientos legales necesarios para solicitar la denominación de origen.
- Recabar información y evidencia histórica del origen e importancia del pulque.
- Realizar una revisión exploratoria sobre el pulque estudiado desde una perspectiva técnico-científica.
- Medir las características fisicoquímicas del pulque y compararlas con las de la literatura.
- Obtener el perfil sensorial del pulque de Hidalgo representado por los municipios Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala.
- Crear un documento de investigación para solicitar la denominación de origen.

Metodología

Debido a la importancia cultural que la región del altiplano central ha tenido en la producción del pulque, se realizaron estudios fisicoquímicos y organolépticos en el estado de Hidalgo representado por tres municipios que son Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala.

Colecta de las muestras

Las muestras de pulque se colectaron de los tinacales tomando parte superficial, media y baja, colectado aproximadamente 1L y posteriormente se guardó en recipientes de plástico. Una vez colectadas las muestras se transportaron en hielo para ser llevadas al laboratorio. En dicho laboratorio se entregaron triplicados por cada muestra para realizar los estudios fisicoquímicos y en los resultados se muestra el promedio de los valores de las muestras por municipio.

Determinaciones fisicoquímicas

Debido a los requerimientos legales de la denominación de origen las determinaciones bromatológicas y fisicoquímicas fueron realizadas en el laboratorio de análisis fisicoquímicos "ASAP". Al laboratorio se le entregaron las muestras que fueron extraídas tratando de seguir las mismas condiciones. Los métodos empleados para realizar cada determinación fisicoquímica son los presentes en la norma NMX-V-037-1972, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Análisis	Método
pH	NMX-V-041-0972
Densidad	NMX-V-032-NORMEX-2010
Azúcares reductores totales	NMX-V-006-NORMEX-2015
Sólidos totales	NMX-V-017-S-1981
Azúcares reductores directos	NMX-V-006-NORMEX-2015
Proteína	NMX-V-029
Gomas	NMX-V-040
Cenizas	NMX-V-017-5-1981
Acidez	NMX-V-042-1972

Tabla 10- Métodos empleados para obtener las determinaciones fisicoquímicas.
Tomado de: norma NMX-V-037-1972.

Estudios organolépticos

El perfil organoléptico del pulque de Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala se realizó aplicando un cuestionario a tres grupos cada uno de los cuales estuvo conformado por 6 a 9 personas las cuales evaluaron las características del pulque por municipio para posteriormente obtener un perfil del pulque con las características que eran compartidas. A dichos grupos se les aplicaba un cuestionario mediante el cual se evaluaban apariencia, olor, textura y sabor, los cuales tenían atributos que se evaluarían numéricamente, esto mediante una escala del 0 al 9 (siendo 0 indicando la ausencia de la característica hasta 9 donde la característica parece estar fuertemente presente). Este cuestionario es el propuesto por Rivas 2014.

Resultados

Determinaciones fisicoquímicas

Cada determinación fisicoquímica del pulque fue realizada siguiendo los métodos presentes en la norma mexicana NMX-V-037. Posteriormente los resultados obtenidos en los informes proporcionados por el laboratorio ASAP se compararon con los de la norma NMX-V-037 para clasificar el pulque en tipo I y tipo II. Esta clasificación está dada por intervalos de valores que cada característica presenta, pero estos intervalos son limitados ya que en algunos casos no es posible que entre en un intervalo, por lo anterior se clasificó el pulque tomando el valor más cercano a uno de los intervalos ya sea los que dictan el tipo I o el tipo II. A continuación, se muestran los resultados de las determinaciones fisicoquímicas por municipio:

El pulque de Epazoyucan, proveniente del barrio San Juan Tizahuapan del rancho “Mario Islas” fue proporcionado por el tlachiquero Mario Islas. Dicha región de donde se extrajeron las muestras se encuentra a una altitud de 2400-2800 metros sobre el nivel del mar con las coordenadas latitud norte 20°, 01’ y 05”, latitud oeste 98° 08’ y 03” y presenta un clima templado semi-húmedo. Las características fisicoquímicas del mismo pulque se presentan a continuación:

Determinación	Promedio del pulque	Tipo
pH	4.2	I
Densidad	1°Bé	
Sólidos totales	1.75 g/100ml	
Azúcares reductores totales	0.49 g/100ml	I
Azúcares reductores directos	0.12 g/100ml	

Gomas	0.11 g/100ml	
Proteína	0.31 g/100ml	
Cenizas	0.20 g/100ml	
Acidez	0.34%	I

Tabla 11- Resultados fisicoquímicos del pulque de Epazoyucan.

Con base en la comparación de los valores obtenidos con los valores de la norma se concluye que el pulque de Epazoyucan pertenecen al tipo I.

El pulque proveniente de la comunidad Tultengo en el municipio de Tepeapulco fue proporcionado por el ingeniero Alfonso Alvarado. Dicha comunidad se encuentra a una altitud de 2500 sobre el nivel del mar presentando un clima templado-frío. Los resultados del laboratorio ASAP se muestran enseguida:

Determinación	Promedio del pulque	Tipo
pH	3.97	I, II
Densidad	1°Bé	
Sólidos totales	1.97 g/100ml	
Azúcares reductores totales	0.59g/100ml	I
Azúcares reductores directos	0.05	
Gomas	0.28 g/100ml	
Proteína	0.28 g/100ml	
Cenizas	0.25	
Acidez	0.41%	I

Tabla 12- Resultados fisicoquímicos del pulque de Tepeapulco.

Con base en la comparación de los valores obtenidos con los valores de la norma se concluye que el pulque de Tepeapulco es del tipo I.

El pulque de Zempoala fue muestreado en la comunidad de Santa Gertrudis, específicamente del tinacal "Hermanos Jiménez" proporcionado por el señor Adán Jiménez. Esta comunidad se encuentra a 2460 metros sobre el nivel del mar y tiene latitud norte 19° 55' y latitud oeste 98° 40' presentando clima templado-frío. El promedio de las características fisicoquímicas se presenta a continuación:

Determinación	Promedio del pulque	Tipo
pH	4.05	I
Densidad	1°Bé	
Sólidos totales	1.79 g/100ml	
Azúcares reductores totales	0.15 g/100ml	I
Azúcares reductores directos	0.11 g/100ml	
Gomas	0.13 g/100ml	
Proteína	0.39 g/100ml	
Cenizas	0.24 g/100ml	
Acidez	0.36%	
		I

Tabla 13- Resultados fisicoquímicos del pulque de Zempoala.

Con base en la comparación de los valores obtenidos con los valores de la norma se concluye que el pulque de Zempoala sugiere ser del tipo I.

En resumen, la comparación de los resultados obtenidos por el laboratorio ASAP se concluyó que el pulque obtenido en la región de Hidalgo, representada por Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala es del tipo I. Concluyendo que el pulque de la región es de alta calidad y que tiene características fisicoquímicas que son consistentes en la región estudiada.

Estudios organolépticos

Los estudios organolépticos se realizaron en cada municipio para obtener el perfil organoléptico del pulque en cada municipio, posteriormente se conjuntaron los datos para obtener el perfil organoléptico del pulque del estado de Hidalgo representado por los municipios antes mencionado. Los resultados obtenidos mediante los cuestionarios se resumen en la Tabla A1 (Anexo).

Para Epazoyucan, los resultados indican que la apariencia del pulque es ligeramente burbujeante, brillante y moderadamente viscosa (Figura 10-A). Presenta una textura poco burbujeante, muy viscosa y uniforme (Figura 10-B). El sabor que presenta es ligeramente ácido y presenta una ligera nota alcohólica y fermentada y sabor a aguamiel, pero un moderado sabor notal fresco (Figura 10-C). El olor que presenta es ligeramente ácido, con olor moderado a agave y a nota fermentada (Figura 10-D).

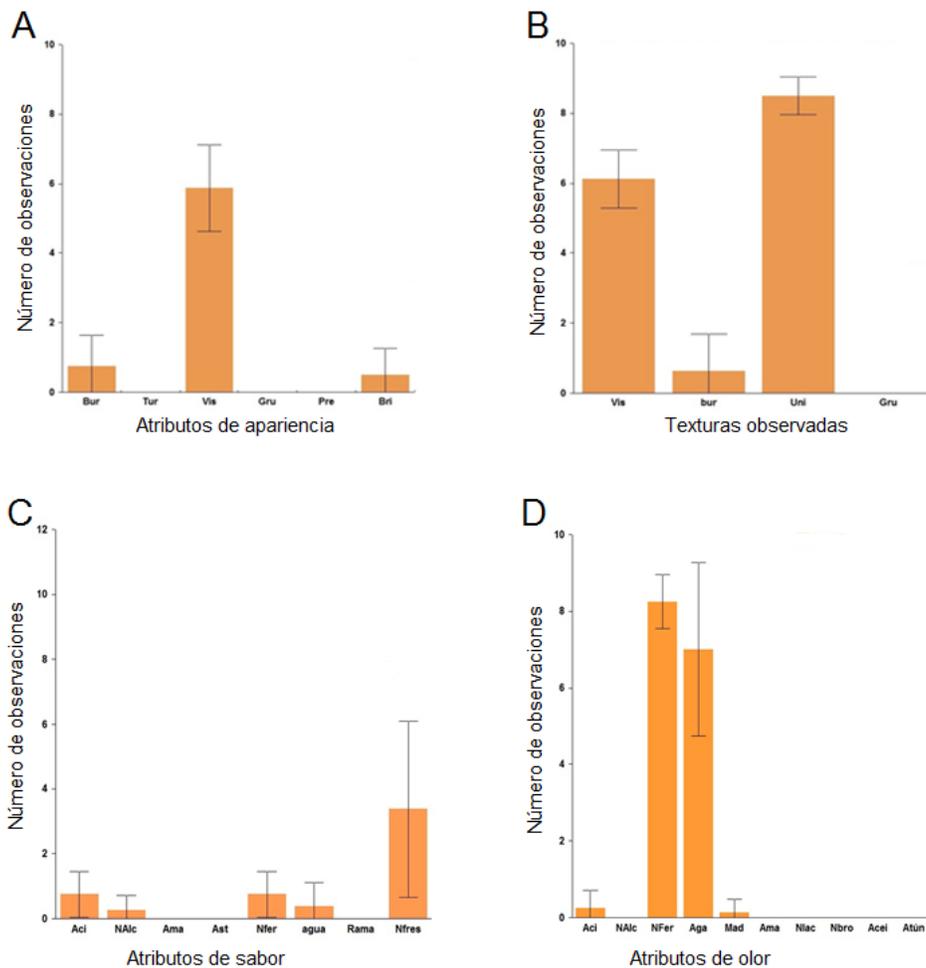


Figura 10- Características organolépticas del pulque de Epazoyucan. **A-** Apariencia del pulque, **B-** Textura del pulque, **C-** Sabor del pulque, **D-** Olor del pulque. (Bur= burbujeante, Tur= turbio, Vis= viscoso, Gru= grumoso, Pre= precipitado, Bri= brillante, Uni= uniforme, Aci= ácido, NAI= nota alcohólica, Ama= amargo, Ast= astringente, Nfer= nota fermentada, Agua= nota aguamiel, Rama= resabio amargo, Nfres= notal fresco, Mad= nota maderosa, Nlac= nota láctica, Nbro= bota a brocoli, Acei= nota aceitosa, Atún= nota atún).

El pulque de Tepeapulco con respecto a la apariencia es burbujeante, viscosa, brillante y ligeramente grumoso y precipitado (Figura 11-A). La textura del pulque presenta los cuatro atributos, siendo viscoso, burbujeante, uniforme y ligeramente grumoso (Figura 11-B). El sabor es ligeramente astringente, amargo y con resabio amargo además de presentar un moderado sabor con nota fermentada, alcohólica y fresca (Figura 11-C). Respecto al olor presentaba un ligero olor ácido,

amargo, maderoso, nota fermentada, nota alcohólica y moderadamente el sabor a agave (Figura 11-D).

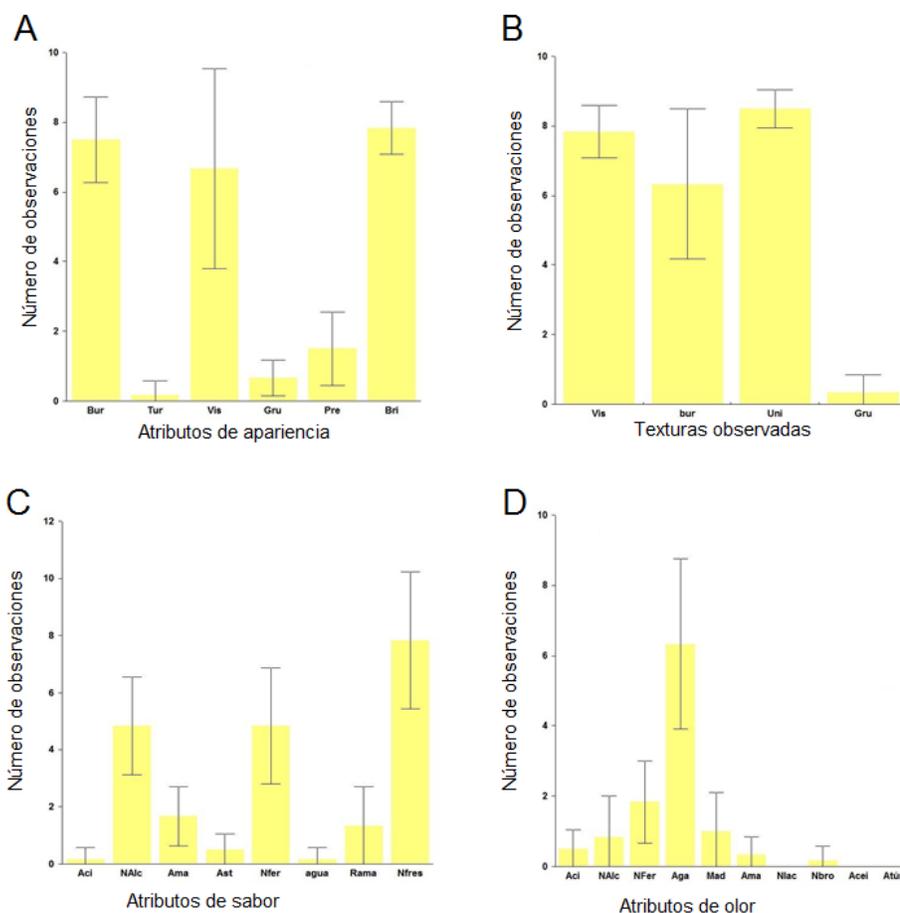


Figura 11- Características organolépticas del pulque de Tepeapulco. A- Apariencia del pulque, **B-** Textura del pulque, **C-** Sabor del pulque, **D-** Olor del pulque. (Bur= burbujeante, Tur= turbio, Vis= viscoso, Gru= grumoso, Pre= precipitado, Bri= brillante, Uni= uniforme, Aci= ácido, NAlc= nota alcohólica, Ama= amargo, Ast= astringente, Nfer= nota fermentada, Agua= nota aguamiel, Rama= resabio amargo, Nfres= notal fresco, Mad= nota maderosa, Nlac= nota láctica, Nbro= bota a brocoli, Acei= nota aceitosa, Atún= nota atún).

La apariencia del pulque de Zempoala este municipio se caracteriza por ser viscoso (Figura 12-A), además la textura que presenta el pulque es ligeramente burbujeante y moderadamente viscosa y uniforme (Figura 12-B). El sabor que presenta es moderado notal fresco y ligeramente ácido, sabor a aguamiel a nota fermentada y alcohólica (Figura 12-C). El olor que presenta es ligeramente ácido y nota alcohólica y moderadamente a agave con nota fermentada (Figura 12-D).

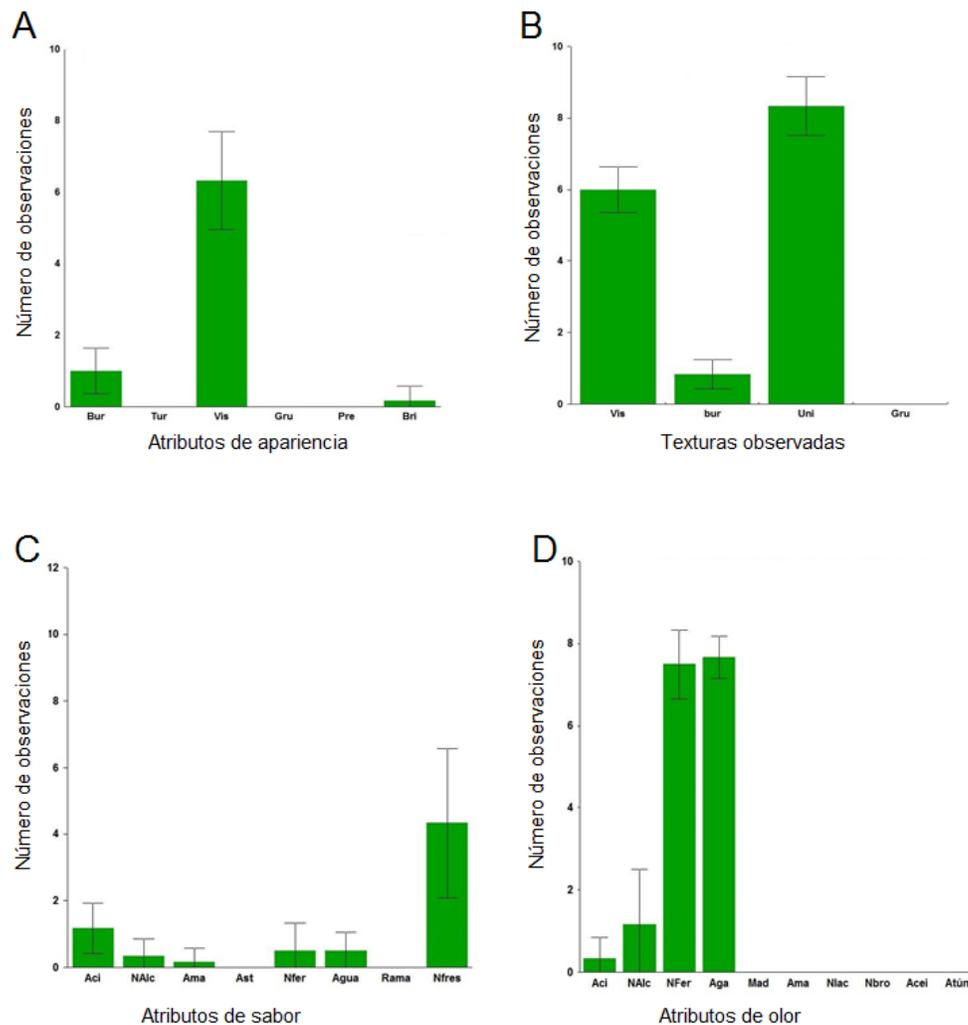


Figura 12- Características organolépticas del pulque de Zempoala. **A-** Apariencia del pulque, **B-** Textura del pulque, **C-** Sabor del pulque, **D-** Olor del pulque. (Bur= burbujeante, Tur= turbio, Vis= viscoso, Gru= grumoso, Pre= precipitado, Bri= brillante, Uni= uniforme, Aci= ácido, NAlc= nota alcohólica, Ama= amargo, Ast= astringente, Nfer= nota fermentada, Agua= nota aguamiel, Rama= resabio amargo, Nfres= notal fresco, Mad= nota maderosa, Nlac= nota láctica, Nbro= bota a brocoli, Acei= nota aceitosa, Atún= nota atún).

Perfil sensorial del pulque de Hidalgo

Con base en el estudio organoléptico realizado se concluye de forma gráfica que el pulque de Hidalgo representado por los municipios de Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala presenta una apariencia burbujeante, brillante y viscosa con una textura uniforme y a la vez burbujeante y viscosa con olor y sabor ácido, olor a agave y notal fermentado y un sabor característico conformado por notal fresco, fermentado, alcohólico y sabor a aguamiel (Figura 13).

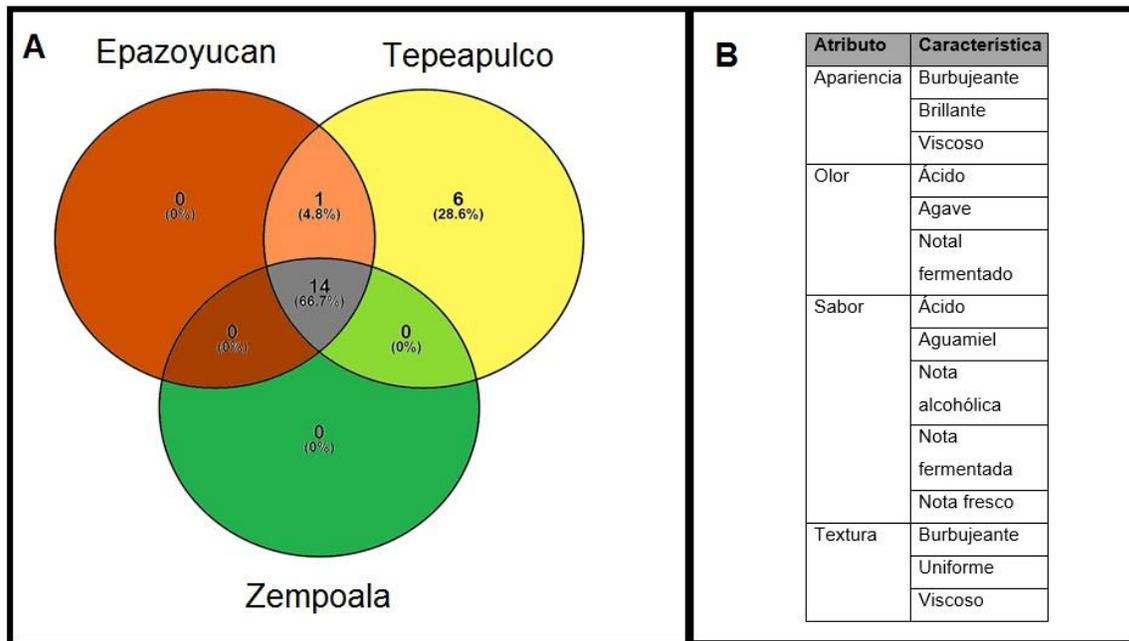


Figura 13- Atributos del pulque de Hidalgo. A: Atributos de apariencia, olor, sabor y textura del pulque de Epazoyucan (naranja), Tepeapulco (amarillo), Zempoala (verde) y compartidos (gris). **B:** Resumen de los atributos compartidos entre los municipios.

Discusión

El pulque ha tenido un papel importante en la cultura mexicana ya que ha estado presente desde la época prehispánica mostrando un auge en el porfiriato; periodo en el que México tenía un gran número de haciendas pulqueras, incluso utilizaba sus vías férreas para el transporte del pulque. Existen regiones como la altiplanicie pulquera que están conformados por estados como Tlaxcala, Estado de México e Hidalgo las cuales han sido pieza clave para la producción del pulque. En la

producción del pulque han sido de suma importancia el manejo humano y las condiciones ambientales, dichos factores pueden tener efecto en las características fisicoquímicas y organolépticas. En el presente estudio el pulque de Hidalgo representado por Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala resultó ser de alta calidad con base en las normas de manejo del pulque. Además del perfil organoléptico del pulque de dichos municipios, el mismo mostró atributos compartidos y sólo el municipio de Zempoala mostró atributos únicos; a pesar que en nuestro estudio no había catadores profesionales de pulque los resultados se mantenían consistentes. Además, los resultados de este estudio se compararon con los del ingeniero Mauro Vázquez realizados en el municipio de Ixmiquilpan en el año del 2011 en el que un grupo de expertos evaluaron las características del pulque proveniente 10 distintas comunidades, observaron que el pulque tenía características únicas, pero al comparar el pulque de las 10 regiones se observaron atributos que compartían (Vázquez et al., 2011). Los atributos compartidos entre el pulque proveniente de las 10 regiones se usaron para comparar los atributos compartidos entre ambos estudios y se encontró que el pulque tiene características organolépticas que lo hacen único como son una apariencia burbujeante, brillante y viscosa, con textura burbujeante y viscosa, con olor a agave y nota fermentada sabor ácido, con notas alcohólicas y fermentadas. Con la comparación anterior se sugiere que a pesar de que las personas a las que se les aplicó los cuestionarios en nuestro estudio no era un grupo de expertos en el tema los resultados del estudio se comparten con la cata realizada por un panel de expertos y se concluye que el pulque cuenta con atributos constantes que lo hacen único para ser pulque.

Conclusión

Con base en la evidencia histórico-geográfica mostrada en el presente documento, así como en los estudios fisicoquímicos y organolépticos, se concluye que se muestra evidencia suficiente para demostrar que el pulque ha sido una bebida muy importante dentro de la cultura mexicana, que cuenta con características fisicoquímicas y organolépticas que la hacen única. Dado las características que presenta tiene potencial para ser protegida con una denominación de origen y así reconocer dicha bebida a nivel nacional e internacional. Dicha denominación de origen, además de proteger a la bebida, puede derivar en un impacto positivo en las regiones productoras al reactivar la economía local en beneficio de las comunidades productoras.

Capítulo II *“Dinámica y diversidad de microorganismos presentes en aguamiel, contrapunta y pulque”*

Antecedentes

Microorganismos reportados previamente

Como ya se describió en los antecedentes del capítulo uno el pulque es una bebida alcohólica fermentada que se obtiene utilizando aguamiel como sustrato (García-Mendoza, 1992). El aguamiel es la savia o azúcares de agaves que se obtiene de un proceso de raspado posterior al castrado y añejamiento (proceso descrito anteriormente en la introducción); es un líquido amarillento, ligeramente turbio y espeso con un sabor dulce, fresco y ligeramente ácido. El aguamiel está compuesto por agua, sacarosa, glucosa, fructosa, fructooligosacáridos, agavinas, proteínas, aminoácidos (excepto metionina), calcio, fósforo, sodio, magnesio, hierro, cobre y zinc, vitaminas como niacina, biotina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico y vitamina C (Escalante A *et al.*, 2012; García-Mendoza, 1992; Lappe-Oliveras, 2008). Este líquido amarillento se añade a tinajas de fermentación donde constantemente se produce pulque en un plazo de 24-48 hrs al producto que se forma en medio de la etapa de producción de pulque se le llama contrapunta. La fermentación es un proceso metabólico realizado por levaduras, bacterias y mohos para la producción de ATP (Escalante A *et al.*, 2016). La fermentación puede clasificarse de acuerdo a su estado físico en el que se realiza (líquido o sólido), por los metabolitos que se obtienen al final del proceso o por el tipo de sustrato en el que se realiza: azucarado, amiláceo, proteico, etc (Steinkraus, 2002). Generalmente el estado físico puede ser líquido o sólido, en la clasificación por producto se encuentra la alcohólica, ácido-láctica y acética (Steinkraus, 2002). En la fermentación alcohólica el piruvato se convierte en etanol liberando CO₂, en la ácido-láctica se produce ácido láctico sin liberación de CO₂, y en la fermentación acética se forma ácido acético a partir de etanol en presencia de oxígeno y la butírica en la que se obtiene ácido butírico a partir de glúcidos en ausencia de oxígeno (López *et al.*, 2004). En la fermentación del pulque se desarrollan tres tipos de fermentación la fermentación alcohólica, ácida y viscosa mediante las cuales se forman productos como etanol, ácido acético y láctico, así como exopolisacáridos como glicerol determinando las características de la bebida (Snowdon, 1991; Srivathsan *et al.*, 2014).

Los microorganismos presentes le brindan características organolépticas gracias a los metabolitos que producen, por ello la importancia de conocer que bacterias y hongos están presentes y para poder descifrar su papel en el nicho que representa el pulque (Escalante A *et al.*, 2016). Conocer la diversidad de microorganismos puede hacerse de diversas formas, entre ellas las técnicas clásicas de microbiología, en las cuales se emplea el uso de medios selectivos para aislar algunos microorganismos e identificarlos y la otra mediante herramientas de genómica, las cuales mediante tecnologías como secuenciación nos permiten conocer gran parte de la diversidad de microorganismos presentes (Bálint *et al.*, 2014; Hu Y, 2017). El estudio de la diversidad de microorganismos presentes en el pulque mediante técnicas de microbiología clásicas se ha realizado

desde el siglo XIX. En 1864 Río de la Loza por primera vez observó el pulque al microscopio. Algunos investigadores como José Barragán, Ángel Gaviño, Antonio Carbajal, Miguel Cordero aislaron distintos microorganismos del pulque y del aguamiel algunos otros como Paul Linder, Gerardo Varela, Ruíz Orozco, Pedro Bretchel, Sánchez Marroquín, Herrera y Calderón Villagómez describieron algunos microorganismos en aguamiel y pulque, así como en algunos casos estudiaron las características metabólicas de los mismos, en la Tabla 18 se muestran los microorganismos identificados hasta el 2016 (de León *et al.*, 2005; Escalante A *et al.*, 2016; Escalante A *et al.*, 2014; García-Mendoza, 1992; Lappe-Oliveras, 2008; Lopez-Díaz *et al.*, 2001). Uno de los principales intereses por estudiar a microorganismos presentes en el pulque ha sido el papel que tiene como probiótico y prebiótico. El grupo del doctor Adelfo Escalante del IBT de la UNAM ha estudiado la diversidad de microorganismos presentes en el aguamiel y el pulque, especialmente la diversidad bacteriana (Escalante A *et al.*, 2004). La diversidad bacteriana identificada por Escalante se resume en la Tabla 14.

Identidad de la clona	No.(%) de clonas detectadas en cada librería de 16S rDNA		
	Aculco	Huitzilac	Tizayuca
<i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> subdivision			
<i>Lactobacillus</i> strain ASF360 AF157050	87 (44.16)	107 (52.71)	51 (26.98)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M99740	73 (37.05)	8 (4.27)	45 (23.80)
<i>L. kefir</i> AB024300	6 (3.04)	ND	3 (1.58)
<i>L. acetotolerans</i> M58801	2 (1.01)	ND	9 (4.76)
<i>L. hilgardii</i> M58821	ND	5 (2.67)	ND
<i>L. plantarum</i> D79210	ND	ND	1 (0.53)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp <i>mesenteroides</i> AB023242	16 (8.12)	1 (0.53)	47 (24.86)
<i>Ln. pseudomesenteroides</i> AB023237	ND	4 (2.13)	ND
<i>Arthrobacter</i> subdivision			
<i>Microbacterium arborescens</i> AB007421	ND	ND	3 (1.58)
<i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i> subdivision			
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> M59051	ND	ND	2 (1.05)
Proteobacteria α -subdivision			
<i>Acetobacter pomorium</i> AJ001632	ND	4 (2.13)	ND
<i>Gluconobacter oxydans</i> AF127396	ND	59 (31.55)	ND
<i>Zymomonas mobilis</i> AF281034	ND	2 (1.06)	2 (1.05)
Proteobacteria β -subdivision			
<i>Hafnia alvei</i> Z83203	11 (5.58)	ND	26 (13.75)

Tabla 14- Bacterias encontradas en el pulque de proveniente de 3 municipios.

Tomada de: Escalante A *et al.*, 2004.

Como anteriormente se mencionó, diversos microorganismos han sido aislados y estudiados, muchas veces para entender su papel en la producción de pulque. Entre dichos microorganismos encontramos a *Zimomonas mobilis* el cual se aisló y se estudió el papel que tenía en la fermentación en el año de 1953 por Sánchez Marroquín, quien descubrió que esta α - Proteobacteria junto con *Saccharomyces cerevisiae* estaba implicada en el proceso de fermentación. *Zimomonas mobilis*

está implicada en la producción de polisacáridos extracelulares (como dextranos y fructanos) además de participar en la fermentación alcohólica como *Saccharomyces cerevisiae* (Escalante A *et al.*, 2012; Lachance, 1995; Sanchez-marroquin & Hope, 1953; Sánchez-Marroquín *et al.*, 1957; Swings & Ley, 1977). Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez evaluaron la presencia de algunos microorganismos en aguamiel y 3 etapas de la fermentación (semilla, contrapunta y corrida), observaron que el número de *Zymomonas* y *Leuconostoc* aumenta en la corrida (Figura 14) siendo mayor el incremento en *Saccharomyces*. Además, se observó que la producción de etanol (Tabla 15) y la concentración de proteínas y azúcares reductores (Figura 15) aumentan significativamente en la misma etapa (Cervantes-Contreras, 2008; Cervantes-Contreras & Pedroza, 2007) concluyendo así que puede haber una fuerte correlación entre el número de bacterias y la producción de etanol en la cual *Saccharomyces* juega un papel clave en la fermentación junto con otros microorganismos como *Zymomonas* y *Leuconostoc* (Cervantes-Contreras, 2008; Cervantes-Contreras & Pedroza, 2007). La clasificación de microorganismos presentes en el pulque puede realizarse con base en sus rasgos metabólicos, Escalante 2016 sugiere cuatro grupos:

- I) Bacterias productoras de ácido
- II) Microorganismos productores de alcohol (*S. cerevisiae*, *Z. bonillis*)
- III) Bacterias productoras de dextrosa (*L. mesenteroides*)
- IV) Microorganismos putrefactivos

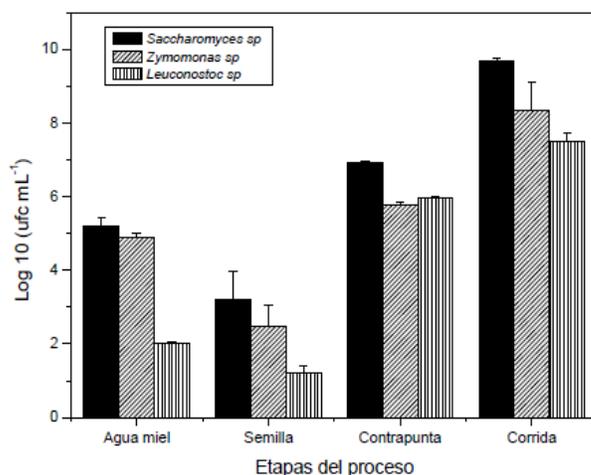


Figura 14- Diversidad de *Saccharomyces*, *Zymomonas* y *Leuconostoc* en aguamiel y 3 etapas de fermentación. Tomada de: Cervantes-Contreras & Pedroza, 2007.

Muestra	Contenido de etanol % (v/v)	
Agua miel	0.26 ^a	0.39 ^b
Semilla	7.01 ^a	7.03 ^b
Contrapunta	6.34 ^a	6.25 ^b
Corrida	10.35 ^a	9.09 ^b

Tabla 15- Concentraciones de etanol en el aguamiel y las etapas fermentativas del pulque artesanal. Tomada de: Cervantes-Contreras & Pedroza, 2007.

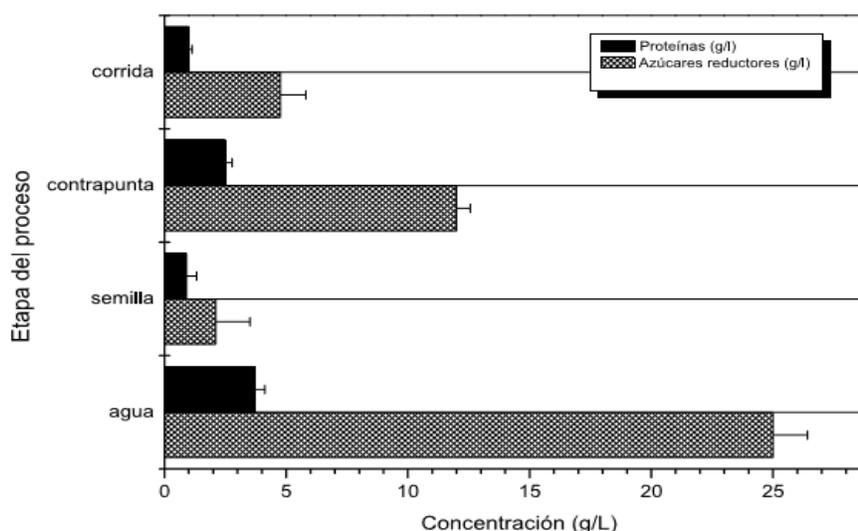


Figura 15- Concentración de proteínas y azúcares reductores durante cada etapa del proceso de fermentación artesanal del pulque. Tomada de: Cervantes-Contreras & Pedroza, 2007.

En el año del 2016 Escalante y colaboradores realizaron un estudio en el que comparaban los microorganismos presentes en pulque de distintos estados como Hidalgo, Morelos y el Estado de México. En dichos estudios, se encontró que el pulque proveniente de estos lugares tenía abundancia similar en grupos de microorganismos como *Lactobacillus acidophilus*, éste siendo el más abundante (~60-80%). Además de esto, se estudió la dinámica de microorganismos presentes en las muestras de aguamiel y en distintos tiempos de fermentación T0, T3, T6 (0,3 y 6 horas) (Escalante A *et al.* 2016). En este estudio muestra la diversidad de microorganismos cultivables y la diversidad independiente al cultivo, cómo cambia el total de levaduras en el aguamiel y en los tiempos de fermentación, la dinámica de la concentración de azúcares y productos como etanol, ácido láctico y ácido acético a lo largo de los tiempos de fermentación T0, T3,T6 y en el aguamiel

(Escalante A *et al.* 2016). La dinámica de las poblaciones de microorganismos mostradas en los estudios de Escalante se sugiere que hay grupos que parecen estar enriquecidos en los tiempos de fermentación como es el caso de las levaduras donde la presencia de las mismas en el aguamiel no es tan abundante como en las etapas fermentativas (Figura 16-A). El proceso fermentativo inicia con una fuente rica en azúcares provenientes del agave (aguamiel) donde la composición de azúcares está mayormente conformada por sacarosa y fructosa además de una pequeña porción de glucosa, dichos azúcares disminuyen al iniciar el proceso de fermentación (Figura 16-A) esto debido a que los microorganismos autóctonos del aguamiel realizan la fermentación utilizando los azúcares (Escalante A *et al.* 2016). En la fermentación los microorganismos que toman los azúcares producen algunos metabolitos como etanol, ácido láctico y ácido acético los cuales no se muestran tan abundantes en el aguamiel, pero dichos productos aumentan durante el proceso de fermentación como lo muestra el trabajo de Escalante A., *et al* 2016 (Figura 16-C).

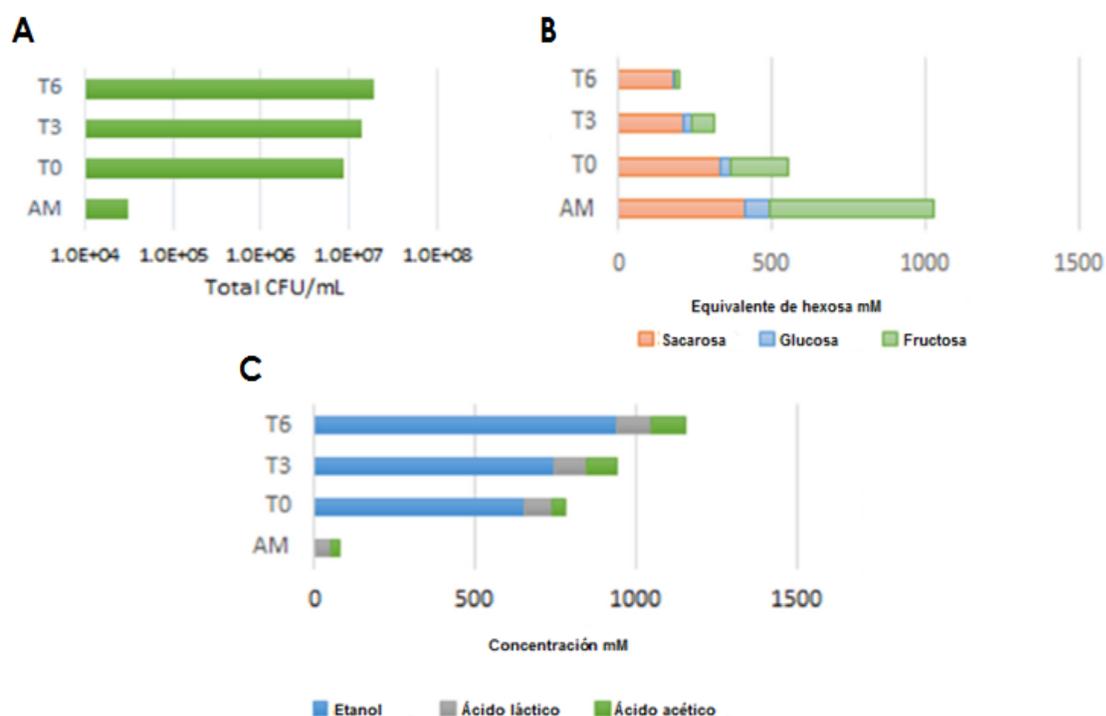


Figura 16- Levaduras, azúcares y alcohol en aguamiel y tres tiempos fermentación.

A-Levaduras presentes en aguamiel y en tres tiempos de fermentación, **B-**Concentraciones de azúcar en el proceso fermentativo y **C-** Concentraciones de etanol, ácido láctico y ácido acético en el proceso fermentativo. Tomado de: Escalante A *et al.* 2016.

Los estudios muestran la importancia que tiene estudiar los microorganismos presentes en la producción del pulque así como la dinámica de los mismos y sus productos; ya que como sugieren los estudios de Cervantes Contreras y Pedroza que en la última etapa de fermentación, justo cuando

ya se tiene el pulque, existe el mayor número de proteínas y azúcares, lo cual lo convierte en una bebida de gran importancia nutrimental, así como muestra de León Tabla 16 y Massieu y Loyola-Montemayor Tabla 17 (Cervantes & Pedroza, 2007; De León *et al.*, 2005; Loyola-Montemayor, 1956; Massieu *et al.*, 1949; Massieu *et al.*, 1959) el contenido de vitaminas y aminoácidos presentes. Los estudios de Escalante muestran una parte importante respecto a la dinámica de bacterias y algunas levaduras, pero aún existe un mundo de otros microorganismos como hongos por conocer y cómo estos participan en la dinámica de la producción del pulque (Escalante A *et al.* 2004; Escalante A *et al.* 2012). Conocer a los microorganismos del sistema resulta muy interesante ya que además de conocer cómo funcionan dichos microorganismos en el medio se pueden encontrar algunos que tengan potencial para otros usos. Los microorganismos reportados hasta el 2017 hasta nivel especie se resumen en la Tabla 18 (Escalante A *et al.* 2004; Escalante A *et al.* 2012; Escalante A *et al.* 2016; Estrada-Godina *et al.*, 2001; Lachance, 1995; Goncalves de Lima, 1990; Ramírez *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2012; Srivathsan *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2007).

Aminoácidos	g/16gN
Isoleucina	4.04
Leucina	8.65
Lisina	1.76
Metionina	1.12
Cisteína	1.59
Fenilalanina	6.45
Tirosina	2.76
Treonina	4.21
Triptófano	2.35
Valina	5.12
Histidina	2.01

Tabla 16- Aminoácidos presentes en el pulque tradicional. (La tabla muestra los gramos presentes por cada 16 gramos de nitrógeno). Tomada de: De León *et al.*, 2005.

Compuestos esenciales	mg 100mL ⁻¹
Aminoácidos	
Lisina	16.2
Triptófano	2.7
Histidina	4.7
Fenilalanina	11.2
Leucina	10.5
Treonina	6.4
Metionina	0.7
Valina	6.6
Arginina	10.9
Tirosina	
Vitaminas	
Tiamina	0.02
Riboflavina	0.025
Niacina	0.32
Piridoxina	--
Biotina	--
Ácido ascórbico	5.6

Tabla 17- Vitaminas y aminoácidos presentes en el pulque tradicional. Tomada de: Cervantes & Pedroza, 2007.

Muestras	Especie
Aguamiel	<p>Acetobaccter: <i>Acetobaccter acetí, malorum y orientalis,</i></p> <p>Acinetobacter: <i>Acinetobacter eadioresistens y radioresistens</i></p>

Candida:

Candida lusitanae

Chryseobacterium:

Chryseobacterium ssp

Citrobacter:

Citrobacter

Cryptococcus:

Cryptococcus spp

Debaryomyces:

Debaryomyces carsonii,

Enterobacter:

Enterobacter spp y aglomerans

Erwinia:

Erwinia rha-pontici y hapontici

Geotrichum:

Geotrichum candidum

Hansenia:

Hansenia sporuvarum

Kluyvera:

Kluyvera acróbata y cochleae

Kluyveromyces:

Kluyveromyces marxianus,

Lactobacillus:

Lactobacillus acidophilus, ssp,y vermiforme

Leuconostoc:

Leuconostoc acidophilus, citreum, kimchi, mesenteroides y pseudomesenteroides

Macrococcus:

Macrococcus caseolyticus

Micrococcus:

Micrococcus letus

Pichia:

Pichia guilliermondii, membranifaciens

Providencia:

Providencia ssp

Saccharomyces:

Saccharomyces cescerevisiae, bayanus, pastorianus y cerevisiae,

	<p>Serratia: <i>Serratia grimensii</i>,</p> <p>Sterotrophomona: <i>Sterotrophomona ssp</i>,</p> <p>Streptococcus: <i>Streptococcus devieseii</i></p> <p>Zymomonas: <i>Zymomonas mobilis</i></p>
Contrapunta	<p>Lactobacillus: <i>Lactobacillu ssp</i></p> <p>Saccharomyces: <i>Saccharomyces ssp</i></p> <p>Zymomonas: <i>Zymomonas ssp</i></p>
Pulque	<p>Acetobacter: <i>Acetobacter aceti y pomorium</i></p> <p>Bacillus: <i>Bacillus simplex y subtilis</i></p> <p>Candida: <i>Candida parapsilosis y valida</i></p> <p>Cellulomonas: <i>Cellulomonas ssp</i></p> <p>Clavidospora: <i>Clavidospora lusitaniae</i></p> <p>Debaryomyces: <i>Debaryomyces carsonii</i></p> <p>Escherichia: <i>Escherichia spp</i></p> <p>Flavobacterium: <i>Flavobacterium johnsoniae</i></p> <p>Geotrichum: <i>Geotrichum candidum</i></p> <p>Gluconobacte: <i>Gluconobacte oxydans</i></p>

	<p>Hafnia: <i>Hafnia alvei</i></p> <p>Hanseria: <i>Hanseria sporauvarum</i></p> <p>Kluyveromyces: <i>Kluyveromyces lactis y marxianus</i></p> <p>Kukuria: <i>Kukuria rosea</i></p> <p>Lactobacillus: <i>Lactobacillus acetotolerans, acidophilus, brevis, hilgardii, kefir y plantarum</i></p> <p>Leuconostoc: <i>Leuconostoc acidophilus, mesenteroides, pseudomesenteroides</i></p> <p>Macrococcus: <i>Macrococcus caseolyticus</i></p> <p>Microbacterium: <i>Microbacterium arborescens</i></p> <p>Micrococcus: <i>Micrococcus caseolyticus y luteus</i></p> <p>Pichia: <i>Pichia guilliermondii y membranifaciens</i></p> <p>Rhodotorula: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i></p> <p>Saccharomyces: <i>Saccharomyces bayanus, pastorianus, cerevisiae y paradoxus</i></p> <p>Sarcina: <i>Sarcina ssp</i></p> <p>Torulaspota: <i>Torulaspota delbrueckii</i></p> <p>Zymomonas: <i>Zymomonas mobilis</i></p>
--	---

Tabla 18- Microorganismos observados en aguamiel, contrapunta y pulque reportados en la literatura. Basada en: Escalante A et al. 2004; Escalante A et al. 2012;

Escalante A *et al.* 2016; Estrada-Godina *et al.*, 2001; Lachance, 1995; Goncalves de Lima, 1990; Ramírez *et al.*, 2004; Salvetti *et al.*, 2012; Srivathsan *et al.*, 2014; Suárez *et al.*, 2007.

Algunos autores han descrito funciones bioquímicas realizadas por los microorganismos presentes en aguamiel y pulque (Salvetti *et al.*, 2012; Srivathsan *et al.*, 2014; Goncalves de Lima, 1990; Quince *et al.*, 2011; Suárez *et al.*, 2007; Escalante A *et al.* 2016; Estrada-Godina *et al.*, 2001; Lachance, 1995). Entre las funciones reportadas se encuentra el papel de la producción de algunos polisacáridos que le confieren viscosidad al pulque, la producción de glicerol, acetato, acetaldehído, etanol, vitaminas, aminoácidos y otros productos (Salvetti *et al.*, 2012; Srivathsan *et al.*, 2014; Goncalves de Lima, 1990; Ramírez *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2007; Escalante A *et al.* 2016; Estrada-Godina *et al.*, 2001; Lachance, 1995). Los microorganismos se encuentran en un ambiente dinámico ya que utilizan los sustratos que se encuentran en el medio y producen algunos metabolitos que pueden servirles de sustrato a otros microorganismos. Además, las condiciones espacio temporales les serán más favorables para algunos géneros que otros, eso es lo que propicia la dinámica y los cambios poblacionales (Escalante A *et al.* 2016). En la Tabla 19 se resume la función descrita de microorganismos encontrados en aguamiel y pulque.

Microorganismos	Función descrita	Referencias
<i>Leuconostoc species</i>	Juegan un papel vital en la producción de polisacáridos los cuales le brindan al pulque viscosidad.	(Salvetti <i>et al.</i> , 2012; Steinkraus, 1997)
<i>Zymomonas mobilis ssp. mobilis</i>	Jugar un papel clave en la fermentación del pulque y produce compuestos como ácido láctico, acetilmetilcarbinol, gomas, acetato, acetona, glicerol, acetaldehído.	(Goncalves de Lima, 1990; Ramírez <i>et al.</i> , 2004; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Steinkraus, 1997; Swings & Ley, 1977)
<i>Saccharomyces (S. cerevisiae, S. bayanus, and S. paradoxus) y no-Saccharomyces (Candida spp., C. parapsilosis, C. lusitaniae, K. marxianus, K. lactis, H. uvarum, Pichia spp., P. guilliermondii, and T. delbrueckii)</i>	Son microorganismos que producen etanol a partir de glucosa, fructosa y sacarosa. Sintetizan vitaminas y aminoácidos, así como compuestos volátiles que influyen con la calidad y perfil aromático de algunas bebidas	(Salvetti <i>et al.</i> , 2012; Steinkraus, 1997; Ramírez <i>et al.</i> , 2004; Sánchez-Marroquín <i>et al.</i> , 1957)

<i>Lactobacilli</i>	Tiene la habilidad de crecer un ambiente ácido, además de tolerar altas concentraciones de etanol y ha sido encontrada en bebidas fermentadas como malt Whisky	(Escalante A <i>et al.</i> 2016)
<i>Candida</i> <i>Kluyveromyces</i>	Producen etanol y toxinas asesinas (killer toxins)	(Estrada-Godina <i>et al.</i> , 2001)
<i>Acetobacter aceti</i> <i>Celullomonas</i> <i>Cryptococcus sp</i> <i>Bacillus simplex</i> <i>Kokuria rosea</i> <i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Pichia sp</i> <i>Torulasporea delbrueckii</i> <i>Macrocooccus caseolyticus</i> <i>Hanseniasporea uvarum</i>	Microorganismos esenciales en la fermentación acética, alcohólica y algunos productos EPS.	(Lachance., 1995)

Tabla 19- Funciones reportadas de los microorganismos presentes en aguamiel y pulque.

Los microorganismos observados mediante técnicas de microbiología clásica y secuenciación de clonas han permitido conocer la diversidad de microorganismos cultivables, pero han dejado inexplorada aquella diversidad no cultivable (Taberlet *et al.*, 2012; Tedersoo *et al.*, 2015). Además de estas técnicas, existen herramientas de metagenómica y secuenciación masiva de amplicones, las cuales permiten explorar la diversidad de microorganismos no cultivables mediante técnicas de secuenciación masiva (Taberlet *et al.*, 2012; Snowdon, 1991).

Secuenciación metagenómica de amplicones

La secuenciación es una técnica mediante la cual se puede obtener el código genético de una secuencia de nucleótidos (Oulas *et al.*, 2015). Los métodos de secuenciación son clasificados como primera, segunda (NGS) y tercera generación (NNGS) (Oulas *et al.*, 2015; Mardis, 2008). Los trabajos de metagenómica y *metabarcoding* emplean métodos de segunda y tercera generación, el primer método usado surgió en el 2004, este realiza secuenciación por pirosecuenciación en la plataforma llamada 454 Life Sciences (Mardis, 2008). Además de 454 Life Sciences, en la actualidad una de las plataformas más utilizadas es Illumina (Miseq y Hiseq). Caporaso y colaboradores concluyen que Miseq y Hiseq producen resultados que son altamente reproducibles (Caporaso *et al.*, 2010). Además de que los resultados son altamente reproducibles la tecnología de Illumina tiene un bajo

costo y un porcentaje bajo de error (Tabla 20) por lo que se ha convertido en una de las tecnologías más populares para secuenciación en metagenómica y metabarcoding (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015).

	Roche 454	IonTorrent PGM	Illumina	PacBio RSII ^a
Longitud máxima de secuencia (pb)	1200	400	300	50,000
Gb de salida x corrida	1	2	1000'	1
Amplificación por librería	Sí	Sí	Sí	No
Costo por Gb (USD)	\$9538.46	\$460.00	\$29.30	\$600
Tipo de error	Indel	Indel	Sustitución	Indel
Tasa de error (%)	1	~1	~0.1	~13
Tiempo de corrida	20h	7.3h	6 días	2h

Tabla 20- Características de tecnologías de secuenciación. Tomada de: Escobar-Zepeda *et al.*, 2015.

Existen dos tipos de secuenciación empleados, el primero “*Shotgun*” usado en metagenómica es un método que permite conocer a todos los microorganismos presentes en el sistema ya que secuenciar los genomas presentes pero esta técnica es costosa computacionalmente y la secuenciación “*Targeted*” o dirigida usada en “*metabarcoding*”, es una técnica que permite conocer diversidad de grupos taxonómicos mediante la comparación de secuencias de genes ribosomales completos o secciones de los mismos o espaciadores genéticos comparando las secuencias contra bases de datos existentes (Escobar-Zepeda *et al.*, 2015; Sharpton, 2014; Srivathsan *et al.*, 2014 White *et al.*, 1990). Los genes ribosomales son empleados debido a su conservación en distintos linajes, entre esos genes se encuentra 16S que permite la identificación de bacterias (Rodicio & Mendoza, 2004; White *et al.*, 1990). Los espaciadores son espaciadores genéticos útiles en la identificación de hongos, los más empleados son ITS1, ITS2, ITS2, ITS4 (Bellemain *et al.*, 2010; Gardes & Bruns, 199; Tedersoo *et al.*, 2015).

El gen 16S de RNA ribosomal (rRNA)

El gen 16S codifica para la subunidad pequeña del ribosoma en bacterias, cloroplastos y mitocondrias. Es un polirribonucleótido de ~1500pb (Figura 17) presente en toda célula por lo que se puede utilizar como un gen marcador para hacer reconstrucciones evolutivas. Presenta estructura y función que ha permanecido conservados a lo largo de mucho tiempo por lo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios (White *et al.*, 1990). Con la secuencia de

los ribosomas se pueden establecer comparaciones mostrando el grado de similitud entre las secuencias lo que indicará su relación evolutiva (Rodicio & Mendoza, 2004). Esta región es muy conservada ya que una mutación en alguna de las regiones podría evitar la construcción efectiva de los ribosomas (Weisburg *et al.*, 1991). El gen 16S rRNA contiene una o más regiones variables que facilitan su uso en estudios filogenéticos como un gen marcador para bacteria y arqueas (Rodicio & Mendoza, 2004; Weisburg *et al.*, 1991). En los procariontes el tiempo de divergencia es profundo y sirve para delimitar especies, no es el caso para hongos y otros eucariotas ya que los genes ribosomales están tan conservados que se prefiere utilizar secuencias intergénicas como el caso de los ITS (Internal, transcribed spacer) (Oulas *et al.*, 2015)

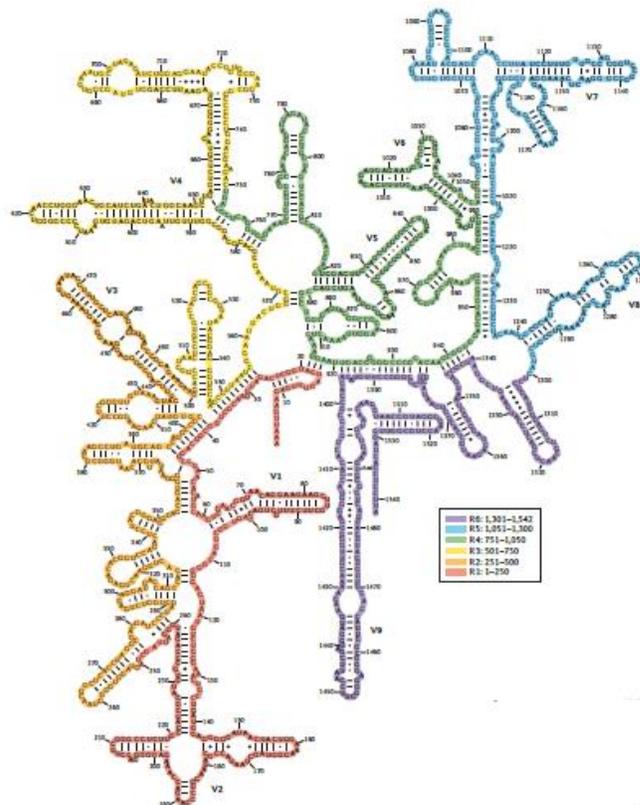


Figura 17- Estructura del gen 16S ribosomal (rRNA) con sus distintas regiones variables en colores. Tomada de: Yarza *et al.*, 2014.

ITS

El espaciador interno de los ribosomas o ITS es una región que contiene dos secciones variables no codificantes que están unidas a rRNA repetitivo entre la unidad pequeña del ribosoma la cual es altamente conservada (5.8S) y la subunidad grande del gen de rRNA (Eva *et al.*, 2010; White *et al.*, 1990). La región ITS tiene un importante sentido biológico en el procesamiento del rRNA, formando

estructuras secundarias, las cuales son necesarias para un correcto reconocimiento de sitios de anclaje y proporcionar los sitios de unión para proteínas durante la maduración del ribosoma (Musters, 1990; Van Der Sande *et al.*, 1992). La región es conservada entre especies o géneros por lo tanto resulta útil para determinar las especies frontera (Bellemain *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 199; Morgan & Blair, 1995). El espaciador interno transcrito generalmente era considerado como una secuencia espaciadora no funcional, pero el análisis funcional de ITS en levaduras y hongos ha mostrado evidencia clara que los espaciadores juegan un rol en reacciones de procesamiento (Musters, 1990; Van Der Sande *et al.*, 1992). Esta región ha sido empleada para la identificación molecular de hongos debido a sus características: es una región pequeña de 600-800bp (Eva *et al.*, 2010; White *et al.*, 1990); pueden ser amplificados con los *primers* universales (Weisburg *et al.*, 1991; White *et al.*, 1990); finalmente se ha demostrado que la región ITS es altamente variable entre distintas especies de hongos (Bellemain *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 1992; Lee & Taylor, 1992).

Existen diversas combinaciones de primers de ITS como lo son ITS1+/ITS4, ITS1+/ITS4B, ITS1F+/ITS4B, NNS3+/NNS4, ITS1/ITS4 (Figura 18) (Tedersoo *et al.*, 2015). La última combinación de primers ha sido exitosa en la identificación de miembros del Phylum *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Bellemain *et al.*, 2010; Gardes & Bruns, 1993; Tedersoo *et al.*, 2015). El Phylum *Ascomycota* representa el más grande, representado con más de 64,000 especies, mientras que el *Basidiomycota* contiene alrededor de 30,000 especies descritas y en total estos dos grupos representan el 79% de las especies de hongos descritas además de mostrar una efectividad del 84% en la identificación de hongos no pertenecientes al subreino *Dikarya* (Bellemain *et al.*, 2010; Gardes & Bruns, 1993).

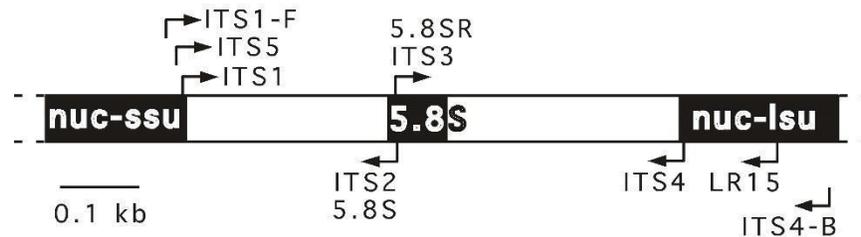


Figura 18- Localización de los distintos espaciadores.

Tomada de: Binder, M., & Hibbett, D. S., 2003.

Clusterización de secuencias para la obtención de OTUs y asignación de filotipos

Carl Woese y colaboradores mostraron que era posible identificar microorganismos mediante la comparación de las secuencias del gen ribosomal RNA y así poder realizar una asignación

taxonómica (Head *et al.*, 1998; White *et al.*, 1990). La asignación taxonómica se realiza con base a la identidad de la secuencia genética comparándola con bases de datos, creando así las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) las cuales pueden ser identificadas a nivel reino, Phylum, Clase, Orden, Familia, Género y Especie. Para realizar la asignación taxonómica de los datos existen diversas herramientas entre las cuales están Mothur, SILVAngs, MEGAN y QIIME (Caporaso *et al.*, 2010; Hill *et al.*, 2003; Huson DH, 2007; Quast *et al.*, 2013; Quince *et al.*, 2011; Schloss *et al.*, 2009).

Procesamiento de datos

En la actualidad QIIME es considerado el estándar dorado para el procesamiento de los datos, este software es capaz de procesar incluso de distintas plataformas de secuenciación como 454e Illumina (Nilakanta *et al.*, 2014) .QIIME es un software de libre acceso que permite preprocesar las secuencias, así como estudiar las comunidades deseadas realizando asignación taxonómica, cálculos de diversidad con datos metagenómicos y comparación de meta perfiles (Caporaso *et al.*, 2010; Escobar-Zepeda *et al.*, 2015). El procesamiento de los datos en QIIME se resume en la Figura 19:

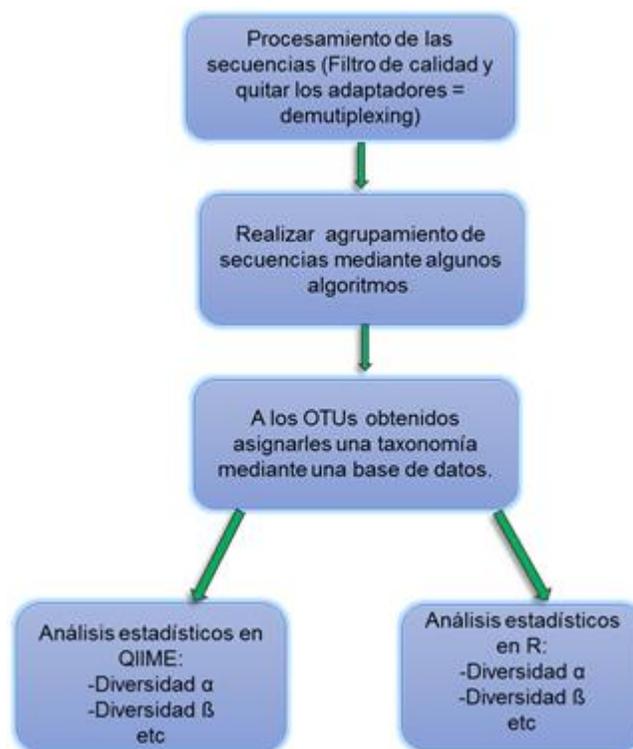


Figura 19- Diagrama del procesamiento de los datos usando QIIME.

Para realizar la asignación taxonómica se requiere una base de datos de referencia para encontrar el *match* más cercano a un OTU, entre estas bases de datos se encuentran Greengenes (16S), Ribosomal Database Project (16S e ITS), Silva (16S+18S) y Unite (ITS) (Oulas *et al.*, 2015; Quast *et al.*, 2013).

Además de estudiar la taxonomía de los microorganismos presentes, se puede estudiar la estructura de la comunidad de microorganismos. El análisis ecológico de la comunidad de microorganismos puede auxiliarse de: curvas de rarefacción, análisis de agrupamiento, diagramas de venn y diversidad del sistema. Este tipo de análisis se realizan con herramientas bioinformáticas entre las cuales destacan programas como R, un lenguaje estadístico de programación en el que se pueden cargar paquetes como Phyloseq, Vegan y Bioconductor los cuales son de utilidad para el análisis de estudios de metabarcoding (Oulas *et al.*, 2015).

Análisis estadísticos de diversidad

Curvas de rarefacción

Las curvas de rarefacción estiman el número de especies esperadas en una muestra tomada al azar. Mediante los datos tomados de un censo o colección de datos y a partir del número de individuos de cada especie, se calcula cuántas especies se esperan en una muestra de n individuos (James & Rathbun, 1981)

Análisis de agrupamiento

Los análisis de agrupamiento permiten comparar información desde múltiples dimensiones de muestras, mediante ellos se pueden visualizar las muestras e interpretar. Entre los métodos para estudiar el agrupamiento encontramos al *Principal Coordinates Analysis* (PCA) y el Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). El primero usa distancias Euclidianas pero el segundo puede usar el rango de órdenes que se pueden ajustar a una variedad de datos diferentes (Ramette, 2007). El NMDS es una técnica ampliamente utilizada en ecología para detectar gradientes en comunidades biológicas (Ramette, 2007). La ventaja del NMDS es que nos permite, al igual que el PCA, reducir la dimensionalidad de nuestros datos originales. Es un método de ordenación adecuado para datos que no son normales o que están en una escala discontinua o arbitraria (Ramette, 2007). Una ventaja del NMDS frente a otras técnicas de ordenación es que, al estar basada en rangos de distancias, tiende a linealizar la relación entre las distancias ambientales y las distancias biológicas (esto es, calculadas a partir de una matriz de sitios x especies) (Ramette, 2007). El resultado de la ordenación se puede visualizar en un gráfico de ordenación. Posteriormente podemos relacionar los ejes resultantes de dicha ordenación con distintas variables ambientales para determinar de manera indirecta el efecto de éstas sobre la matriz de sitios x especies (Ramette, 2007).

Diagramas de Venn

La finalidad de los diagramas de Venn es representar y mantener relaciones entre ellos, al conseguir una intersección con base en la posición en la que se agrupan los datos de las muestras. Por medio de sus relaciones se identifican visualmente las similitudes y diferencias entre grupos (Shade & Handelsman, 2012). El uso de los diagramas de Venn en *metabarcoding* permite explorar el core del microbioma presente en las muestras, así como los grupos asociados a cada muestra (Shade & Handelsman, 2012).

Índices de diversidad

Estimar la diversidad es importante para entender la estructura y dinámica de la comunidad. Existen dos medidas de diversidad la α y la β , la primera permite estimar la diversidad entre la comunidad, se estima como el número de especies en la comunidad, mientras que la diversidad β estima la diversidad de especies compartidas y su distribución (Fakruddin & Mannan, 2013). Medir la diversidad α resulta importante para comparar la diversidad global en diferentes comunidades. Entre los métodos para medirla se encuentran métodos basados en la medición cualitativa como Chao1 y métodos basados en medidas cuantitativas como los índices de Shannon y Simpson (Chao, 1984; Hill *et al.*, 2003; Simpson, 1949).

Chao 1 es un estimador no paramétrico que no asume una distribución particular de la abundancia de especies, sino que usa la información de las frecuencias de las especies raras observadas para estimar el número de especies no detectadas por el muestreo (Chao, 1984; Gotelli & Chao, 2013). Es calculado como:

$$Chao1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde S es el número de especies en la muestra, a el número de OTUs que están representados por individuos únicos y b es el número de OTUs representados por dos individuos.

El índice de Shannon es una medida de entropía que muestra la heterogeneidad de una comunidad tomando en cuenta el número de especies presentes y su abundancia relativa. Dependiendo de la resolución empleada para definir los OTUs puede dar más importancia a los OTUs raros y resulta un método más sensible a los cambios absolutos en la abundancia además de llegando a subestimar el valor verdadero de una comunidad por una cobertura incompleta (Hill *et al.*, 2003; Pla, 2006). Siendo su fórmula:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Donde p_i es la abundancia relativa de cada especie en la población.

El índice de Simpson permite medir la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a dos diferentes especies, la probabilidad va del 0 al 1 (Simpson, 1949). Este índice le da más importancia a los OTUs que son dominantes por lo que y además se ve menos afectado por la cobertura (Simpson, 1949). Se calcula de la siguiente forma:

$$Simpson = \sum p_i^2$$

Donde p_i es la abundancia relativa de cada OTU en la población

Justificación

El pulque es una bebida ancestral que contiene microorganismos autóctonos que participan en la producción del pulque. Actualmente se encuentran estudios en los cuales se han observado bacterias y algunas levaduras cultivables, las cuales están implicadas en la producción del pulque. Hoy en día no existen estudios donde se explore la diversidad de hongos y bacterias no cultivables en el aguamiel, contrapunta y pulque ni cómo va cambiando la dinámica de estos grupos a lo largo del proceso de fermentación. Además del estudio de la diversidad de hongos y bacterias, no se han estudiado las interacciones entre hongos y bacterias, resulta interesante estudiar dichas interacciones, ya que se conoce que algunas bacterias producen metabolitos que inhiben el crecimiento de algunos hongos comportamientos que se sugiere están regulando el nicho. Debido a la poca información que se tiene hasta ahora, se busca explorar mediante el uso de herramientas genómicas y bioinformáticas bajo una perspectiva de *metabarcoding* la diversidad de hongos y bacterias en aguamiel, contrapunta y pulque, así como su dinámica a lo largo de la fermentación del pulque proveniente de Tepeapulco, Hidalgo. El conocer más sobre la diversidad de microorganismos abre una puerta a la aplicación de los mismos en otros sistemas por ejemplo para mejorar la producción de algunas bebidas y alimentos como quesos; además del potencial biotecnológico de los metabolitos y microorganismos implicados para su uso en la industria alimentaria y en consumo humano con fines nutracéuticos y/o medicinales.

Hipótesis

El proceso de fermentación del pulque está mediado por microorganismos. Debido a la naturaleza del proceso fermentativo y a las interacciones de los microbios a lo largo del tiempo, se esperan observar dinámicas y cambios de la estructura de la comunidad microbiana que definen la producción del pulque.

Objetivo General

Estudiar la diversidad de microorganismos (hongos y bacterias) presentes en el aguamiel, contrapunta y pulque, su diversidad, dinámica a lo largo de la fermentación y la función de los géneros más abundantes.

Objetivos particulares

- *Describir la diversidad de OTUs en aguamiel, contrapunta y pulque.
- *Observar de forma global el agrupamiento de las muestras al comparar los OTUs a nivel Phylum para datos de hongos y bacterias mediante análisis multivariado
- *Identificar a los géneros de bacterias y hongos más abundantes.
- *Estudiar la dinámica de los géneros más abundantes, en el proceso de fermentación del pulque.
- *Predecir funciones bioquímicas de los géneros más abundantes de bacterias y hongos, a partir de los perfiles taxonómicos.

Metodología

Debido a que los resultados del perfil organoléptico muestran que el pulque de Tepeapulco presenta atributos de apariencia, textura, sabor y olor únicos a comparación del pulque de Epazoyucan y Zempoala; y considerando que geográficamente Tepeapulco se encuentra más cerca de Apan el cual ha sido reconocida como una región históricamente clave, se propuso como la primer región clave para estudiar la dinámica y diversidad de los microorganismos a lo largo del proceso de

fermentación. El proceso de fermentación representado por el sustrato en forma de aguamiel, etapa media de la fermentación o contrapunta y el producto final, pulque.

Colecta y procesamiento de las muestras

El aguamiel, pulque y contrapunta empleado para los análisis de *metabarcoding* fueron proporcionadas por el Ingeniero Alfonso Alvarado. El pulque proviene de la comunidad Tultengo localizada en el municipio de Tepeapulco en estado de Hidalgo (Figura 20).



Figura 20- Localización del municipio Tepeapulco en el mapa del estado de Hidalgo (en amarillo). Tomado de: www.mapasparacolorear.com

Este municipio pertenece a la región del Altiplano que también es conocida como Altiplanicie pulquera; históricamente al igual que otros municipios de Hidalgo y otros estados ha sido importante en la producción de pulque y producción de agaves desde tiempos ancestrales (García-Mendoza, 1992; CONABIO, 2013).

Para este estudio se colectó aguamiel de *Agaves Salmiana* los cuales crecieron a una altitud de 2500 sobre el nivel del mar en un clima templado-frío (Figura 21). Los agaves tenían una edad aproximada de 9 años los cuales habían tenido un tiempo de añejamiento aproximado a 8 meses y 3 meses bajo producción de aguamiel. El aguamiel extraído fue extraído en la mañana, siendo este el primer aguamiel del día. Se colectó aproximadamente 1 L en total; vez colectado fue guardado en tubos de 50ml.



Figura 21- Planta adulta de *Agave salmiana* y extracción de aguamiel. Proporcionada por: Alfonso Alvarado.

Las muestras de contrapunta y aguamiel se tomaron de los tinacales obteniendo parte superficial, media y baja y al igual que el aguamiel fue colectado aproximadamente 1L y posteriormente guardado en tubos de 50ml. Una vez colectadas las muestras se trasladaron en hielo hasta guardarlas a 4°C. El proceso se resume en el siguiente esquema:

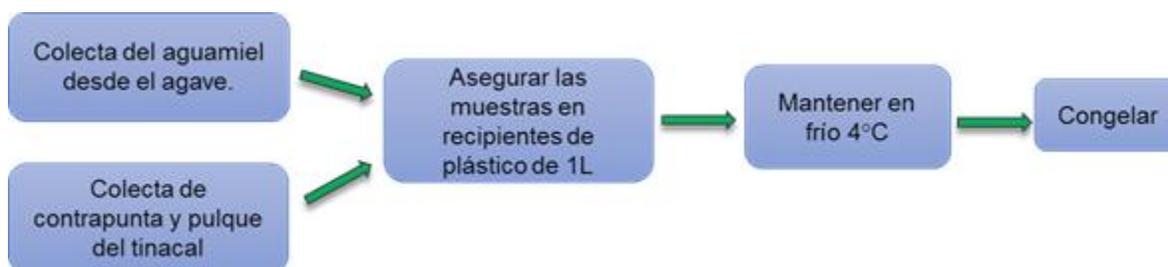


Figura 22- Diagrama que resume la colecta de muestras de aguamiel, contrapunta y pulque.

Extracción de ácidos nucleicos

El pulque es una bebida que contiene diversos metabolitos que le brindan propiedades de sabor, olor y consistencia. La consistencia viscosa que presenta puede resultar inconveniente para la extracción de DNA, pero con algunas modificaciones a protocolos ya establecidos se puede lograr. La modificación en el presente trabajo básicamente se resume en realizar dos veces el proceso para

cada muestra, en base al protocolo sugerido por la marca. Se trabajó con muestras de aguamiel, contrapunta y pulque, los tres tipos de muestras se trabajaron de la misma forma.

La extracción de DNA se realizó utilizando el reactivo DNAzol Reagent de la marca invitrogen. En este método una muestra biológica es homogenizada con DNAzol y el DNA es precipitado con etanol y finalmente es lavado y disuelto en agua (Chomczynski *et al.*, 1997). El proceso de extracción de DNA se resume en los siguientes puntos:

- 2x.
- 1- A un tubo de 1.5 ml agregar 200l de muestra y 1ml de DNAzol
 - 2- Centrifugar 10 min a 10000 g
 - 3- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
 - 4- Agregar 0.5ml de etanol al 100% y mezclar por inversión por 1-3min
 - 5- Centrifugar y remover el sobrenadante
 - 6- Lavar 2 veces el DNA precipitado con 1 ml de etanol al 75%
Por cada lavado es necesario invertir el tubo con etanol entre 3-6 veces, dar un spin y decantar el etanol
 - 7- Una vez lavado el DNA dejar secar disolver en 300µl de agua

Amplificación por PCR

El DNA utilizado para la amplificación estaba a una concentración de ~50ng/µl. Se procedió a realizar PCR con sus respectivos oligos para la amplificación de ITS y 16S. Para la amplificación del ITS se utilizaron los espaciadores ITS1 y ITS4, se utilizaron los oligonucleótidos en sentido ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') y el oligonucleótido en antisentido ITS4 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'), mientras que la región del 16S amplificada fue V3 con los *primers* 357F (CTCCTACGGGAGGCAGCAG) y 939R (CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC). El contenido del mix para realizar el PCR se resume en:

Agente	Cantidad
DNA	1µl
Respectivo amplicón Forward	1µl
Respectivo amplicón Reverse	1µl

Mezcla de nucleótidos y enzima	12.5 μ l
Agua	9.5 μ l
Volumen total	25 μ l

Las condiciones de PCR fueron:

95°C por 3 minutos

25 Ciclos de:

95°C x 30'

55°C x 30'

72°C x 30'

72°C x 5 min

4°C

La construcción de las librerías descrito arriba fue realizada en el departamento de Servicios Genómicos – UGA Langebio Cinvestav.

Secuenciación

La secuenciación de las muestras se realizó mediante la tecnología de Illumina Miseq en el departamento de Servicios Genómicos – UGA Langebio Cinvestav. El proceso de secuenciación se resume en:



Figura 23- Diagrama que resume el proceso de secuenciación.

Filtrado de calidad de los datos

Una vez obtenidos los datos de secuenciación se procedió al filtrado de calidad de los mismos. El filtrado consiste en evaluar la calidad de las secuencias y posteriormente filtrarlas asegurarse que solo se sometieron las secuencias con alta calidad, se seleccionaron las secuencias que tenían un Phred de 20, lo que indicaría que la probabilidad de cada base sea correcta es de 99%.

Clusterización de secuencias para la obtención de OTUs y asignación de filotipos

Para la obtención de OTUs se utilizó el pipeline QIIME y para la asignación taxonómica se utilizó QIIME con la base de datos de Greengenes para 16S y UNITE para la asignación de ITS. Donde el porcentaje de identidad de secuencias para los agrupamientos fue del 97%.

Análisis estadísticos

Para realizar las curvas de rarefacción, análisis de agrupamiento, diagramas de Venn y las gráficas de diversidad se utilizó el lenguaje de programación R.

Papel biológico de los géneros más abundantes

Para la descripción de los géneros más abundantes se tomó a los que tuviesen al menos 10 miembros y se procedió a revisar en la literatura las características reportadas y así poder sugerir su papel en el sistema.

Resultados

Calidad del muestreo metagenómico y análisis de diversidad microbiana en la fermentación del pulque

Las curvas de rarefacción muestran que la diversidad es mayor en aguamiel, luego contrapunta y más baja en pulque. Esto se infiere de la pendiente de las curvas de rarefacción por cada muestra (Figura 24).

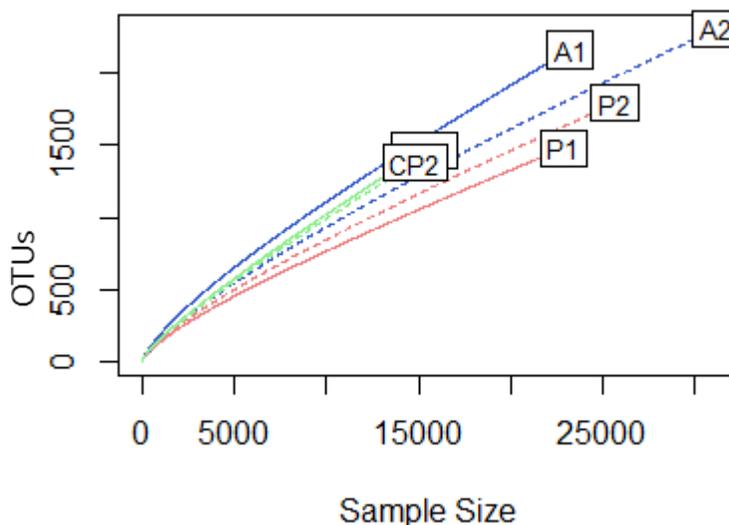


Figura 24 – OTUs bacterianos observados por tamaño de muestra. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

La diversidad de especies de hongos observadas en aguamiel muestra que aún hay diversidad por conocer si se amplía el tamaño de la muestra, también es donde mayor diversidad de hongos existe en nuestro muestreo. En el caso de contrapunta y pulque la diversidad de especies de hongos observadas es muy baja y de igual forma si se amplía el tamaño de muestra puede observarse más diversidad (Figura 25). Para profundizar sobre la calidad del muestreo se utilizó el índice de Chao1 para evaluar la cantidad de OTUs esperados a partir de la frecuencia de los OTUs de baja abundancia.

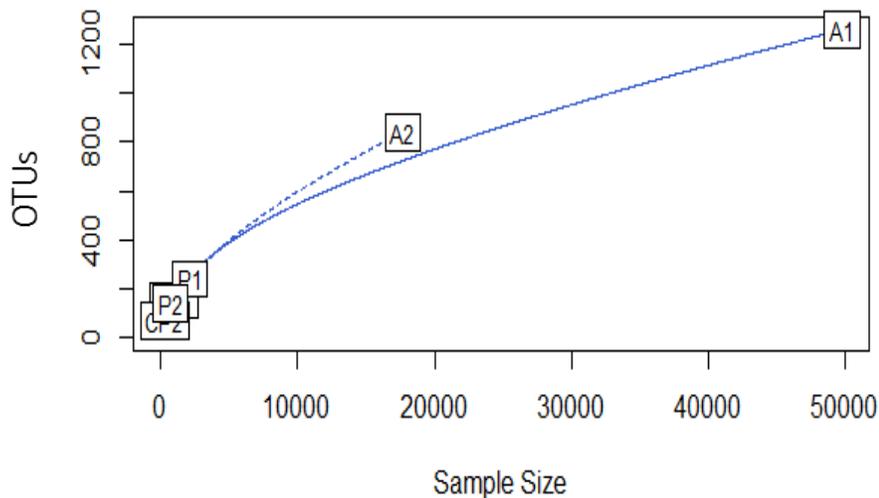


Figura 25 - OTUs de hongos observados por tamaño de muestra. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

La diversidad observada de bacterias es cercana en aguamiel y contrapunta, se observan más OTUs en el siguiente orden, de mayor a menor: aguamiel, pulque y contrapuntas. La diferencia entre el número de OTUs observados y esperados (Chao1) no es muy grande por lo que se tiene un buen muestreo (Figura 26).

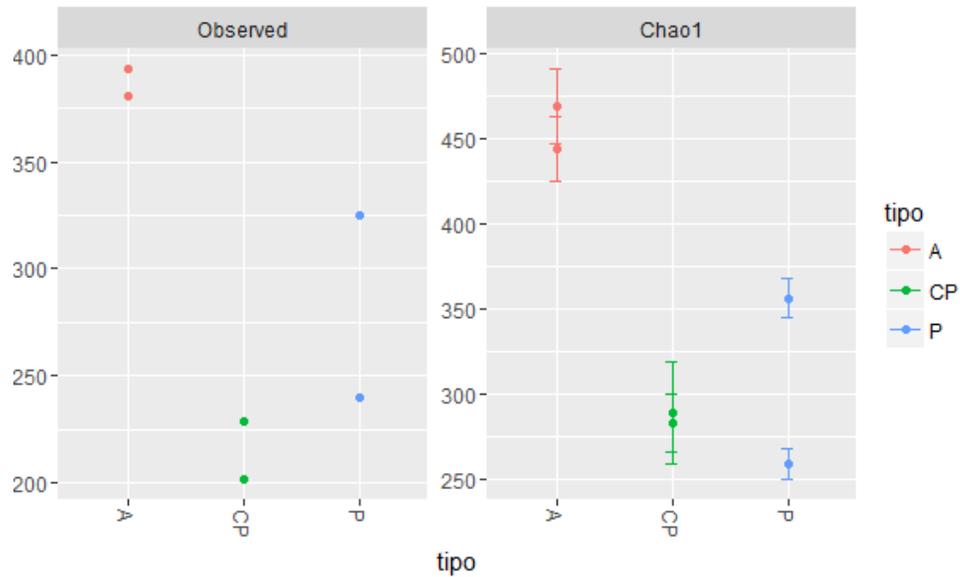


Figura 26- Diversidad observada e índice de Chao1 en OTUs bacterianos. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

La diversidad bacteriana calculada por el índice de Shannon demuestra que la contrapunta sería lo más diverso en comparación con aguamiel y el menos diverso es el pulque. Este índice se ve afectado por la ocurrencia de OTUs en baja abundancia. Simpson muestra que la contrapunta es un sistema muy dominado, es decir, muy pocas especies están en baja abundancia; mientras que el aguamiel y el pulque están con números de Simpson que indican equitatividad, es decir, los OTUs que se encuentran ahí están en proporciones equivalentes, sin dominancia de unas cuantas especies (Figura 27).

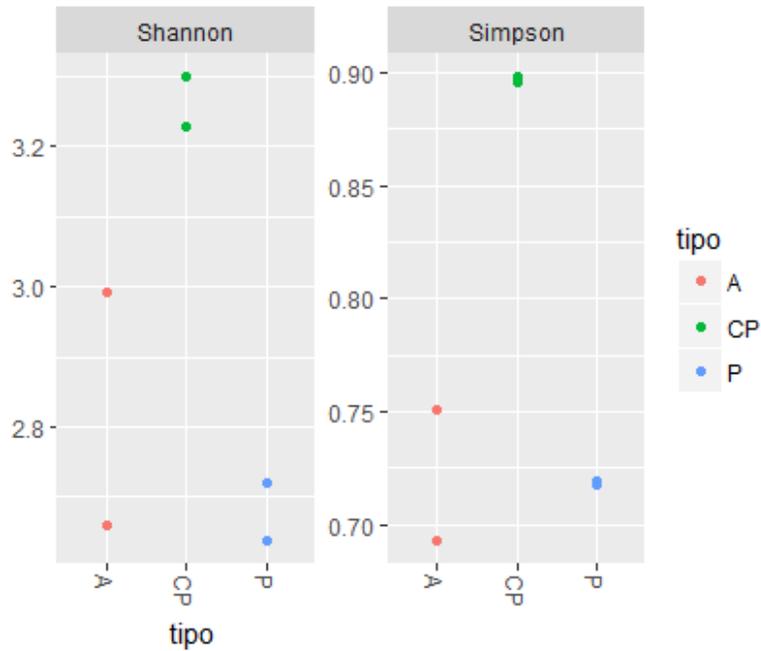


Figura 27- Índice de Shannon y Simpson en OTUs bacterianos. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

La diversidad de hongos observada es muy cercana en las muestras de aguamiel. Se observaron más OTUs fúngicos en pulque, seguido de contrapunta y finalmente aguamiel con menos OTUs fúngicos. Al comparar los OTUs observados con el índice de Chao y debido a que los valores son cercanos se concluye que se tiene un buen muestreo (Figura 28).

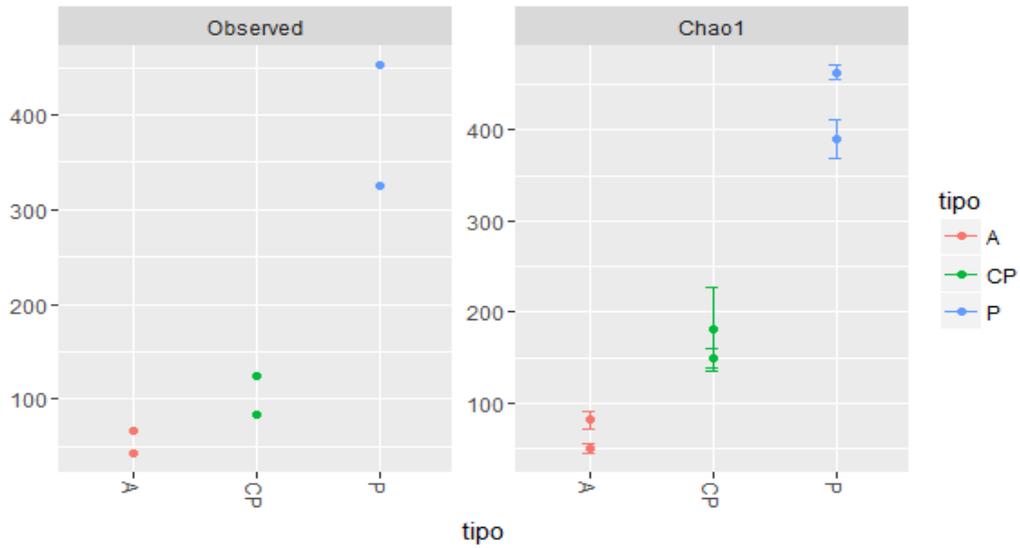


Figura 28- Diversidad observada e índice de Chao1 en OTUs de hongos. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

El índice de Shannon para los OTUs fúngicos muestran que las muestras de pulque son las más diversas, seguidas de contrapunta, por último, el aguamiel (Figura 29). El índice de Simpson muestra que pulque y contrapunta tienen OTUs dominantes mientras que en el aguamiel las especies está distribuidas de forma equitativa (Figura 29).

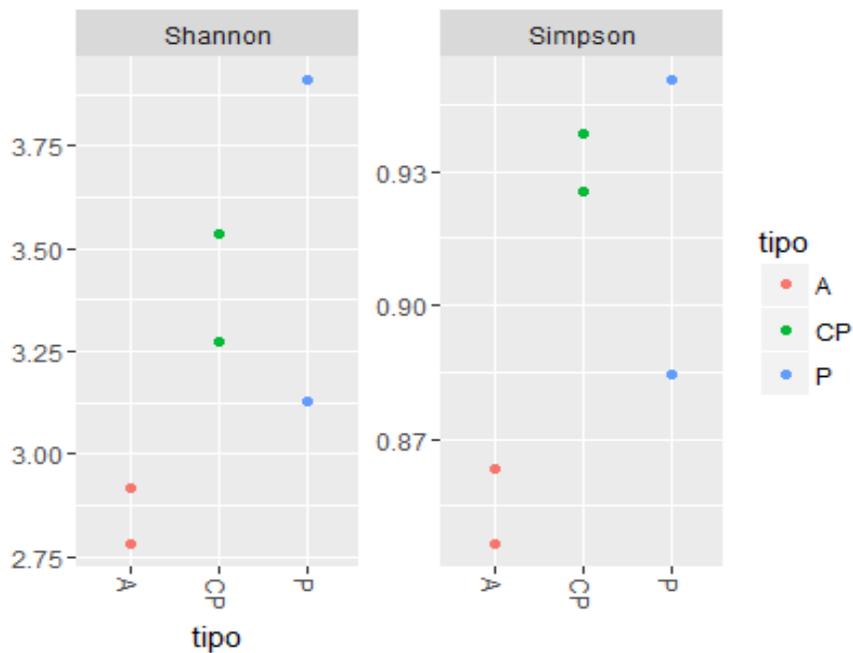


Figura 29- Índice de Shannon y Simpson en OTUs de hongos. P1 y P2= muestra 1 y 2 de pulque, CP1 y CP2= muestra 1 y 2 de contrapunta, A1 y A2= muestra 1 y 2 de aguamiel.

Análisis de ordenamiento y la similitud en las comunidades microbianas

Al observar el agrupamiento de las muestras bacterianas con respecto a la abundancia de OTUs y su similitud se observa una clara separación por cada parte del proceso de fermentación: aguamiel, contrapunta y pulque. Donde las muestras se agrupan según su tipo mostrando así que los OTUs observados por muestra son sumamente similares (Figura 30).

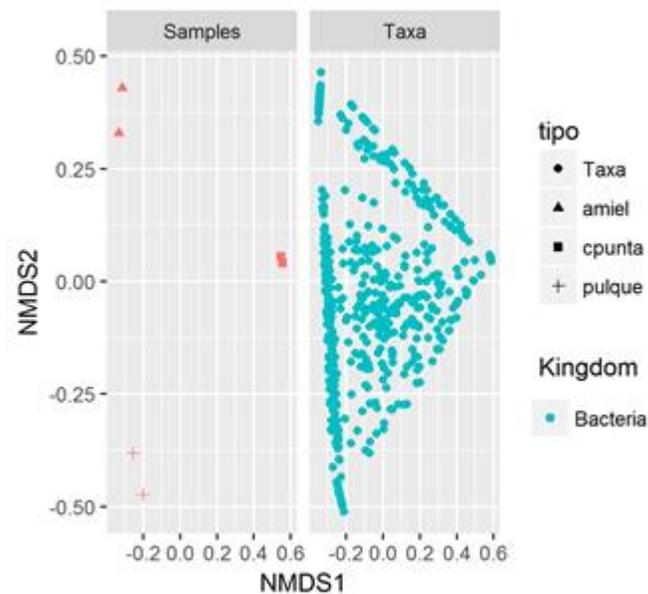


Figura 30 - Agrupamiento de los OTUS bacterianos.

En el caso de los hongos no se observó una clara agrupación entre las muestras, hay más distancia pero tampoco se observó un empalme entre distintos tipos de muestras (Figura 31).

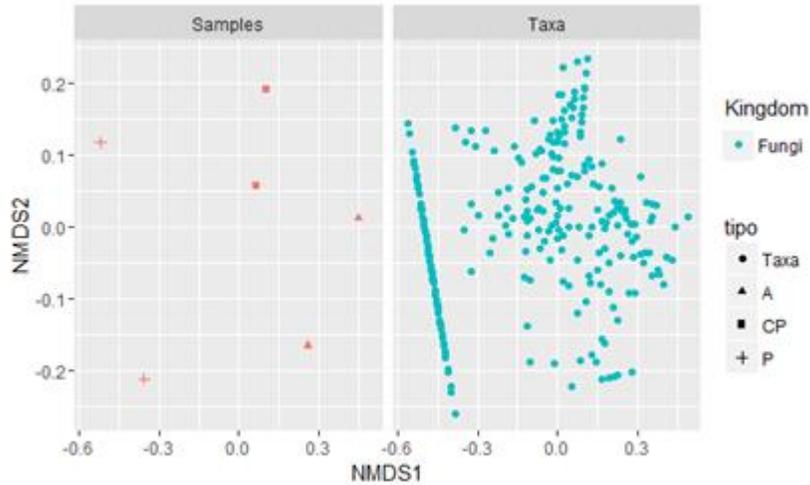


Figura 31- Agrupamiento de los OTUs fúngico.

El mayor número de OTUs compartidos entre muestras se observó entre aguamiel y pulque tanto para bacterias como para hongos. Además, se observó que el número mayor de OTUs únicos encontrados por muestra fue en aguamiel tanto para OTUs bacterianos y de hongos. Del total de los 8,807 OTUs bacterianos observados, se detectaron 197 compartidos en aguamiel, contrapunta y pulque los cuales se mantienen constantes a lo largo del proceso de fermentación, además se presentan grupos de OTUs específicos por muestra (Figura 32). Los 197 OTUs a nivel género están representados por *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Halomiconema*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Marivita*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Weissella*.

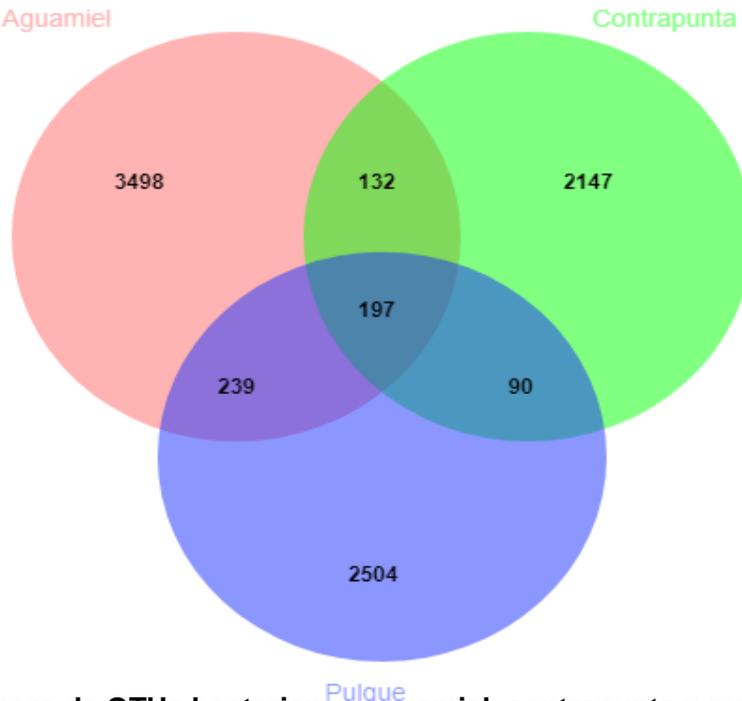


Figura 32- Número de OTUs bacterianos aguamiel, contrapunta y pulque..

Del total de los 1971 OTUs de hongos observados, 59 fueron los observados en aguamiel, contrapunta y pulque sugiriendo que estos son constantes a lo largo de la fermentación. Además, se encontraron OTUs específicos por muestra (Figura 33). Los 59 OTUs compartidos a nivel género están representados por *Aureobasidium*, *Candida*, *Clavispora*, *Epicoccum*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, es decir los 59 OTUs pertenecen a alguno de estos géneros.

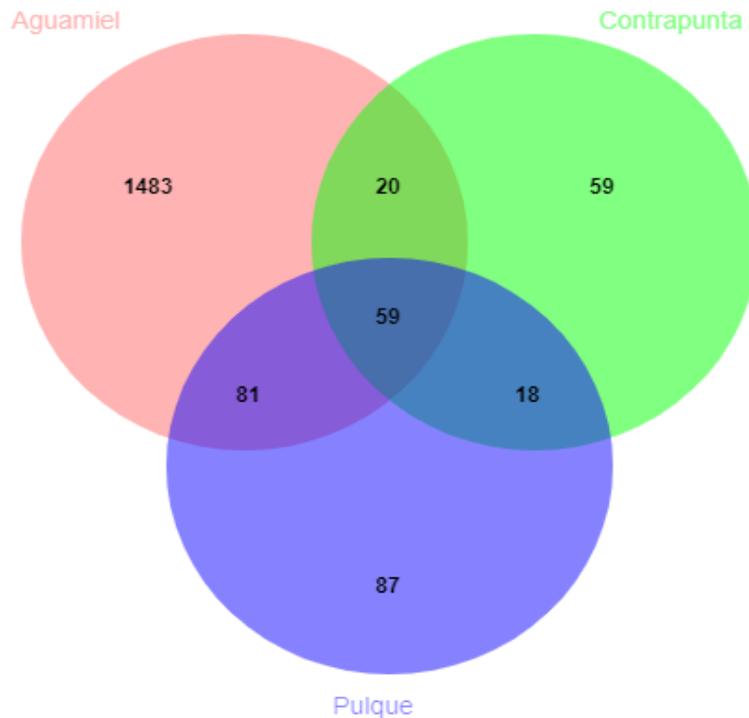


Figura 33- Número de OTUs de hongos en aguamiel, contrapunta y pulque.

A nivel Phyla que se observaron en las muestras de aguamiel, contrapunta y pulque son Proteobacteria y Firmicutes (Figura 34). La abundancia que presentaron estos Phyla fue mayor en las muestras de aguamiel y pulque tanto para *Proteobacteria* y *Firmicutes*. En las muestras de aguamiel la abundancia de Proteobacterias, así como en las muestras de aguamiel se encontraba entre 10,000-15,000 OTUs, mientras que en pulque oscilaban entre 7,500-9,000 OTUs y en contrapunta ~4,000 OTUs (Figura 35). Para el Phylum *Firmicutes* la abundancia observada en las muestras de pulque presentaba valores cercanos a ~1,125-1,250 OTUs la abundancia menor encontrada en contrapunta con ~750 OTUs para ambas muestras (Figura 36).

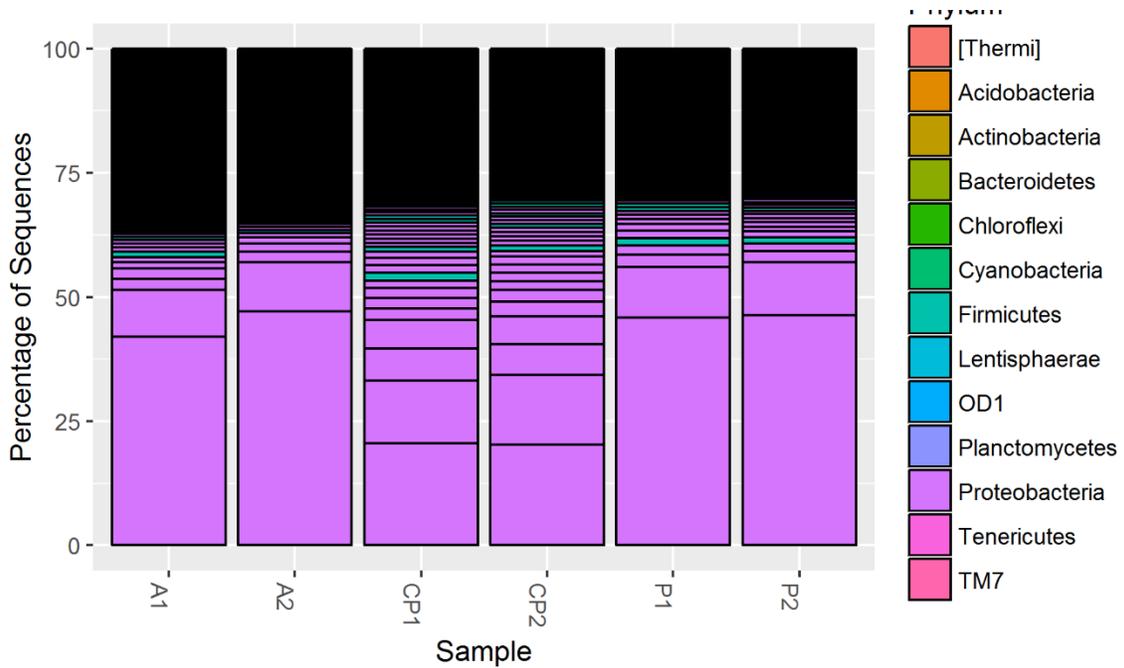


Figura 34- Abundancia relativa de bacterias a nivel phyla en aguamiel (A), Contrapunta (CP) y pulque (P). Cada separador horizontal corresponde a un solo OTU.

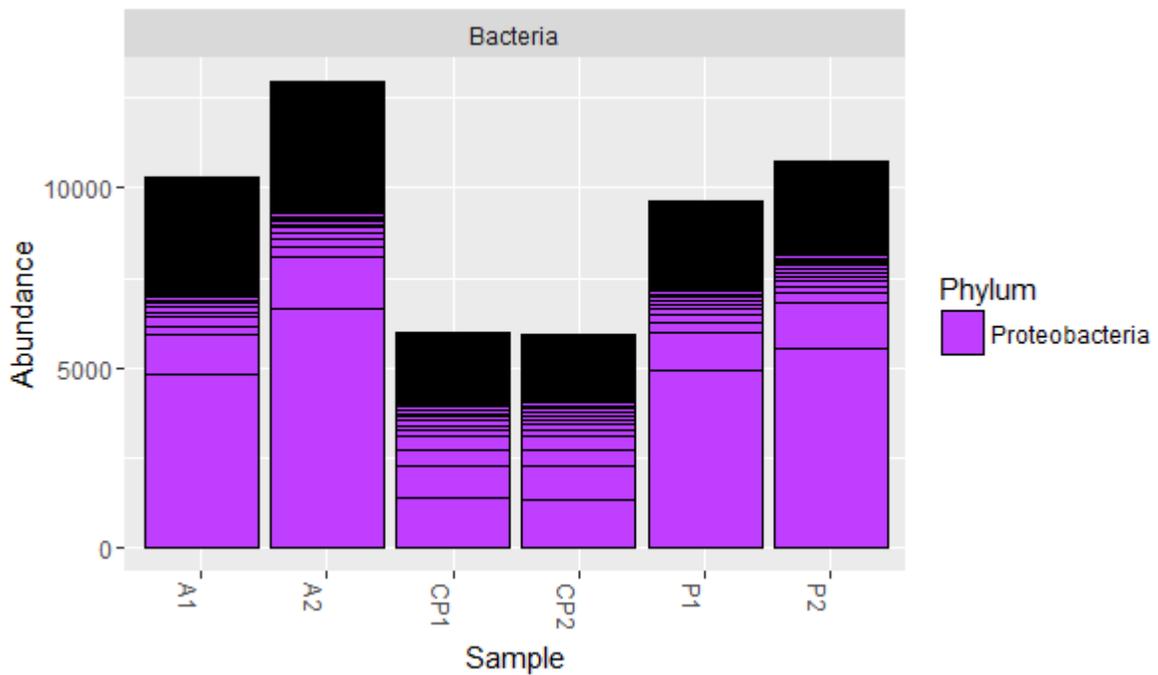


Figura 35- Abundancia de los miembros del phylum Proteobacteria. Cada separador horizontal corresponde a un solo OTU.

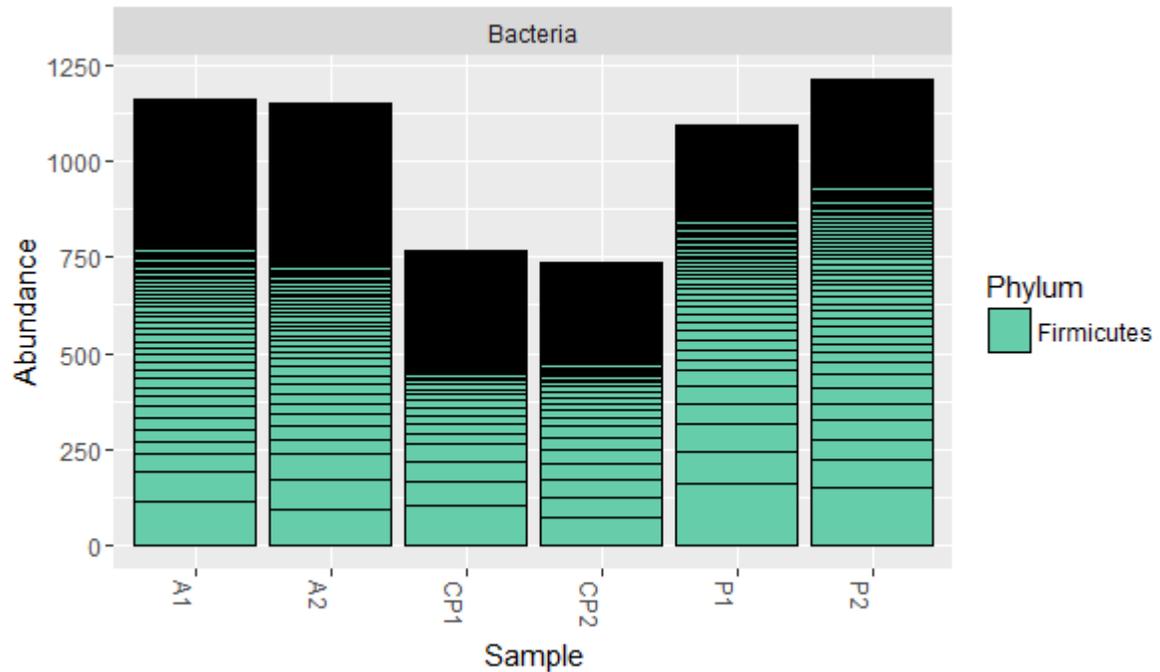


Figura 36- Abundancia de los miembros del phylum Firmicutes. Cada separador horizontal corresponde a un solo OTU.

El phylum de hongos más abundante, que se observó en las muestras de aguamiel, contrapunta y pulque fue Ascomycota. Este se observó en porcentajes mayores al 70% en todas las muestras (Figura 37). La abundancia que presenta este phylum fue mayor en las muestras de aguamiel (Figura 37), la abundancia de Ascomycota en las muestras de aguamiel se encontraban entre 20,000-10,000 OTUs, mientras que en pulque y aguamiel la abundancia se encontraba en menos de 500 OTUs (Figura 38).

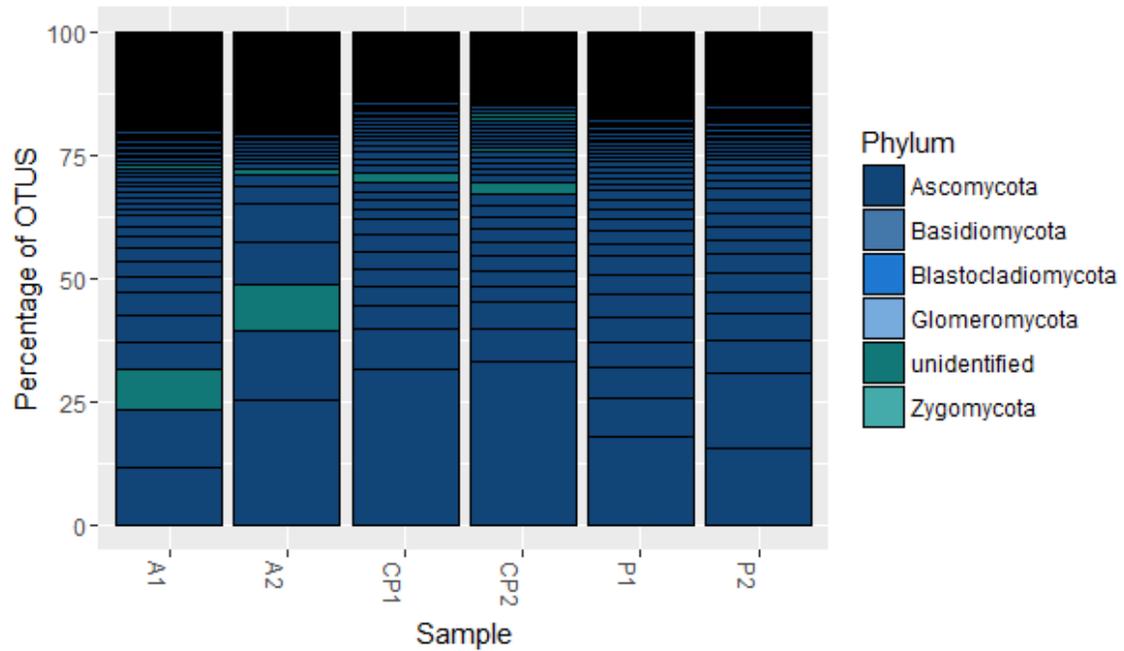


Figura 47- Abundancia relativa de bacterias a nivel phyla en aguamiel (A), Contrapunta (CP) y pulque (P). Cada separador horizontal corresponde a un solo OTU.

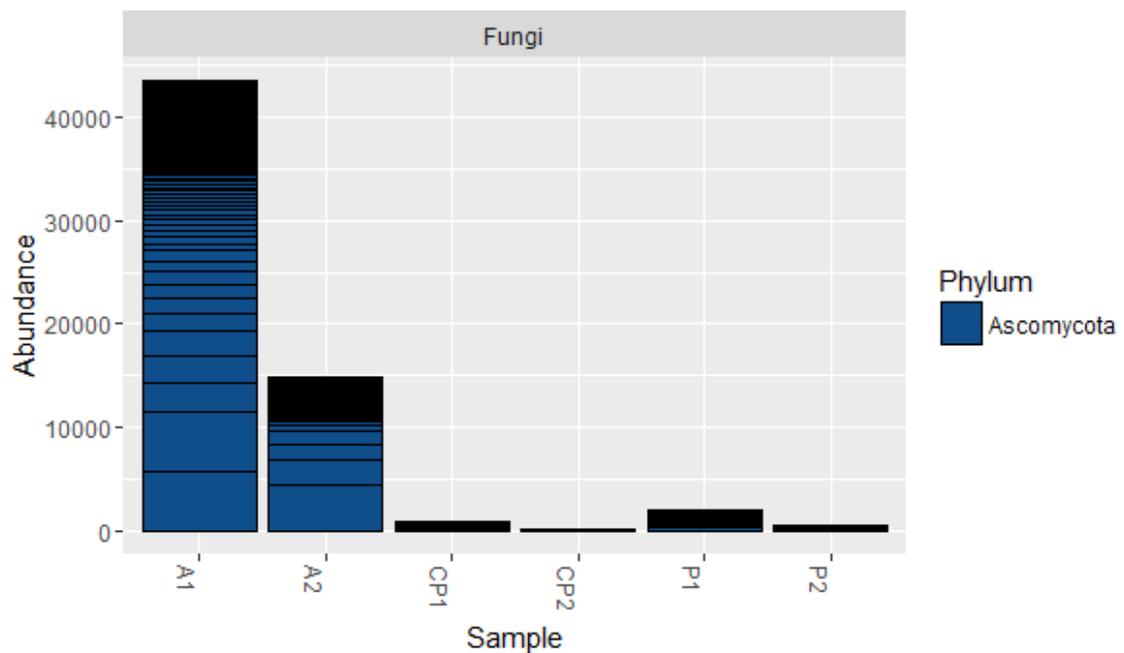


Figura 38- Abundancia de los miembros del phylum Ascomycota. Cada separador horizontal corresponde a un solo OTU.

OTUs observados

En el presente estudio se observaron miembros de los phyla fúngicos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota*. Así como los phyla bacterianos: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Lentisphaerae*, *OD1*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* y *TM7*. Los phyla bacterianos más abundantes fueron *Proteobacteria* y *Firmicutes* representado por más del 95% en las muestras, mientras que el Phylum más abundante en el caso de los hongos fue en *Ascomycota* presente en todas las muestras, mostrando una abundancia mayor al 85% en todas las muestras. El número de OTUs bacterianos, así como el número de géneros fue mayor que el de hongos, dichos resultados se muestran en la Tabla 21. Los géneros con más secuencias obtenidos mediante el 16S fueron un total de 10 mientras que del ITS fueron 13 (mostrados en azul en la Tabla 21).

16S rRNA	#OTUs	ITS	#OTUs
<i>Sphingomonas</i>	6093	<i>Penicillium</i>	413
<i>Acetobacter</i>	1139	No identificado	323
<i>Lactobacillus</i>	568	<i>Candida</i>	238
No identificado	435	<i>Kluyveromyces</i>	157
<i>Leuconostoc</i>	141	<i>Clavispora</i>	150
<i>Acinetobacter</i>	109	<i>Saccharomyces</i>	127
<i>Lactococcus</i>	71	<i>Aureobasidium</i>	92
<i>Gluconobacter</i>	36	<i>Kazachstania</i>	65
<i>Serratia</i>	26	<i>Dekkera</i>	40
<i>Gluconacetobacter</i>	13	<i>Torulaspora</i>	33
<i>Weissella</i>	12	<i>Neophaeosphaeria</i>	29
<i>Synechococcus</i>	9	<i>Cryptococcus</i>	24
<i>Bdellovibrio</i>	6	<i>Pichia</i>	19
<i>Acholeplasma</i> , <i>Arcobacter</i>	5	<i>Cladosporium</i>	10
<i>Sphingobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Enterobacter</i>	4	<i>Rhodotorula</i>	8
<i>Euzebya</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Sphingopyxis</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Devosia</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Flavobacterium</i>	3	<i>Phaeosphaeria</i>	7
<i>Luteimicrobium</i> , <i>Pseudoclavibacter</i> , <i>Microbulbifer</i> , <i>Rhodovibrio</i> , <i>Marivita</i> , <i>Trichococcus</i> , <i>Kaistobacter</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>B-42</i>	2	<i>Zygosaccharomyces</i>	6
<i>Nitriliruptor</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Demequina</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Intrasporangium</i> , <i>Desulfurispora</i> , <i>Salinibacterium</i> ,	1	<i>Paraphaeosphaeria</i> , <i>Cystofilobasidium</i> , <i>Epicoccum</i>	4

<i>Halomicronema, KSA1, Ethanoligenens, Ardenscatena, Pseudanabaena, Rhodovulum, Bacillus, Uliginosibacterium, Campylobacter, Terriglobus, Candidatus Entotheonella, Prevotella, Glaciecola, Virgibacillus, Tanticharoenia, Rubellimicrobium, Neoasaia, Pleomorphomonas, Balneimonas, Amaricoccus, Sulfurospirillum, Lutibacterium, Chelativorans, Commensalibacter, Sarcandra, Rhodobacter, Paracoccus, Mycoplana, Adlercreutzia, Dysgonomonas, Alkaliphilus, Chryseobacterium, Olivibacter</i>			
		<i>Hanseniaspora, Dictyosporium, Ochrocladosporium, Teratosphaeria, Galactomyces</i>	3
		<i>Bullera, Pyrenochaeta, Termitomyces, Xylaria, Arthrotrys, Tubeufia, Alternaria, Phialosimplex</i>	2
		<i>Phialophora, Stagonosporopsis, Westerdykella, Debaryomyces, Leptosphaeria, Allomyces, Humicola, Lipomyces, Phaeotheca, Phoma, Caloplaca, Sporobolomyces, Ramaria, Bagliettoa, Emericella, Phaeomoniella, Lacazia, Arthroascus, Davidiella, Acarospora, Catenulostroma, Cryptodiscus, Phaeothecoidea</i>	1

Tabla 21-Géneros de bacterias y hongos observadas en el presente estudio en muestras de aguamiel, contrapunta y pulque.

Diversos hongos de bacterias y hongos fueron observados aguamiel, la etapa media de fermentación o contrapunta y pulque. Siendo contrapunta la etapa con más géneros encontrados en este trabajo que en estudios anteriores. A continuación, en la Tabla 22 se muestran los OTUs a nivel género:

Muestras	Géneros observados
Aguamiel	<p><i>Acarospora</i>*, <i>Acetobacter</i>~, <i>Acinetobacter</i>~, <i>Agrobacterium</i>~, <i>Allomyces</i>*, <i>Alternaria</i>*, <i>Amaricoccus</i>~, <i>Arcobacter</i>~, <i>Arthrobotrys</i>*, <i>Aureobasidium</i>*, <i>B-42</i>~, <i>Balneimonas</i>~, <i>Bdellovibrio</i>~, <i>Bifidobacterium</i>~, <i>Bullera</i>*, <i>Caloplaca</i>*, <i>Campylobacter</i>~, <i>Candida</i>*, <i>Candidatus Entotheonella</i>~, <i>Catenulostroma</i>*, <i>Cellulosimicrobium</i>~, <i>Chryseobacterium sp</i>°, <i>Citrobacter</i>°, <i>Cladosporium</i>*:, <i>Clavispora</i>*, <i>Clostridium</i>~, <i>Coprococcus</i>~, <i>Corynebacterium</i>~, <i>Crhyseobacterium</i>~, <i>Cryptococcus</i>*, <i>Cryptodiscus</i>*, <i>Cystofilobasidium</i>*, <i>Davidella</i>*, <i>Debaryomyces</i>*, <i>Dekkera</i>*, <i>Demequina</i>~, <i>Devosia</i>~, <i>Dictyosporium</i>*, <i>Emericella</i>*, <i>Enterobacter</i>~, <i>Epicoccum</i>*, <i>Erwinia</i>~, <i>Ethanoligenes</i>~, <i>Euzebya</i>~, <i>Flavobacterium</i>~, <i>Galactomyces</i>*, <i>Geotrichumcandidum</i>°, <i>Glaciecola</i>~, <i>Gluconacetobacter</i>~, <i>Gluconobacter</i>~, <i>Halomiconema</i>~, <i>Halomiconema</i>~, <i>Hanseniaspora</i>*, <i>Humicola</i>*, <i>Kaistobacter</i>~, <i>Kazachstania</i>*, <i>Kluyvera</i>°, <i>Kluyveromyces</i>*, <i>KSA1</i>~, <i>Lacazia</i>*, <i>Lactobacillus</i>~, <i>Lactococcus</i>~, <i>Leuconostoc</i>~, <i>Lipomyces</i>*, <i>Luteimicrobium</i>~, <i>Macrococcus</i>°, <i>Micrococcus</i>°, <i>Marivita</i>~, <i>Mesorhizobium</i>~, <i>Microbulbifer</i>~, <i>Neosasaia</i>~, <i>Neophaeosphaeria</i>*, <i>Ochrocladosporium</i>*, <i>Paeosphaeria</i>*, <i>Paraphaeosphaeria</i>*, <i>Penicillium</i>*, <i>Phaeomoniella</i>*, <i>Phaeotheca</i>*, <i>Phaeothecoidea</i>*, <i>Phialosimplex</i>*, <i>Phoma</i>*, <i>Pichia</i>*, <i>Pleomorphomonas</i>~, <i>Prevotella</i>~, <i>Proteus</i>~, <i>Providencia sp</i>°, <i>Pseudoclavibacter</i>~, <i>Ramaria</i>*, <i>Rhodobacter</i>~, <i>Rhodototula</i>*, <i>Rhodovibrio</i>~, <i>Rhodovulum</i>~, <i>Saccharomyces</i>*, <i>Serratia</i>~, <i>Sphingobium</i>~, <i>Sphingomonas</i>~, <i>Sphingopyxis</i>~, <i>Sporobolomyces</i>*, <i>Stagonosporopsis</i>*, <i>Sterotrophomona</i>°, <i>Streptococcus</i>°, <i>Synechococcus</i>~, <i>Teratosphaeria</i>*, <i>Termitomyces</i>*, <i>Terriglobus</i>~, <i>Torulaspora</i>*, <i>Trichococcus</i>~, <i>Tubeufia</i>*, <i>Uliginosibacterium</i>~, <i>Virgibacillus</i>~, <i>Weissella</i>~, <i>Xylaria</i>*, <i>Zygosaccharomyces</i>*</p>
Contrapunta	<p><i>Acetobacter</i>~, <i>Acinetobacter</i>~, <i>Adlercreutzia</i>~, <i>Agrobacterium</i>~, <i>Arcobacter</i>~, <i>Ardenscatena</i>~, <i>B-42</i>~, <i>Bdellovibrio</i>~, <i>Chelativorans</i>~, <i>Clostridium</i>~, <i>Commensalibacter</i>~, <i>Corynebacterium</i>~, <i>Desulfurispora</i>~, <i>Devosia</i>~, <i>Epicoccum</i>*, <i>Erwinia</i>~, <i>Gluconacetobacter</i>~, <i>Gluconobacter</i>~, <i>Halomiconema</i>~, <i>Hanseniaspora</i>*, <i>Instrasporangium</i>~, <i>Kaistobacter</i>~, <i>Klebsiella</i>~, <i>Kluyveromyces</i>*, <i>Lactobacillus</i>~, <i>Lactococcus</i>~, <i>Leptosphaeria</i>*, <i>Leuconostoc</i>~, <i>Luteimicrobium</i>~, <i>Lutibacterium</i>~, <i>Marivita</i>~, <i>Mesorhizobium</i>~, <i>Mycoplana</i>~, <i>Paracoccus</i>~, <i>Phialophora</i>*, <i>Proteus</i>~, <i>Pseudanabaena</i>~, <i>Pseudomonas</i>~, <i>Pyrenochaeta</i>*, <i>Rhodobacter</i>~, <i>Rhodovibrio</i>~, <i>Saccharomyces</i>*, <i>Serratia</i>~, <i>Sphingobium</i>~, <i>Sphingomonas</i>~, <i>Sulfurospirillum</i>~, <i>Synechococcus</i>~, <i>Tanticharoenia</i>~, <i>Virgibacillus</i>~, <i>Weissella</i>~</p>

Pulque

Acetobacter~, *Acinetobacter*~, *Agrobacterium*~, *Alkaliphilus*~, *Alternaria**,
Arcobacter~, *Arthroascus** *Bacillus*~, *Bagliettoa**, *Bdellovibrio*~, *Candida**,
*Clavidospora**, *Cryptococcus**, *Debaryomyces**, *Dekkera**, *Dysgomonas*~,
*Epicoccum**, *Euzebya*~, *Flavobacterium*~, *Galactomyces**, *Geotrichum*
candidum°, *Gluconacetobacter*~, *Gluconobacter*~, *Hafnia*°, *Halomicronema*~,
Hanseria°, *Kazachania**, *Klebsiella*~, *Kluyveromyces**, *Kukuria*°,
Lactobacillus~, *Lactococcus*~, *Leuconostoc*~, *Macrococcus*°, *Marivita*~,
Microbacterium°, *Microbulbifer*~, *Micrococcus*°, *Nitriliruptor*~, *Pichia**,
*Pyrenochaeta**, *Rhodotorula* sp°, *Rhodovulum*~, *Riminococcus*~,
Rubellimicrobium~, *Saccharomyces**, *Serratia**, *Sphingobium*~,
Sphingomonas~, *Sphingopyxis*~, *Streptomyces*~, *Synechococcus*~,
*Torulaspora**, *Weissella*~, *Westerdykella**

Tabla 22- OTUs a nivel género observados en aguamiel, contrapunta y pulque. (~OTU bacteriano, *OTU fúngico, °género reportado en estudios anteriores).

Dinámica de los géneros microbianos más abundantes en la fermentación

Los géneros más abundantes (mostrados en azul en la Tabla 21) presentan distintas dinámicas a lo largo del proceso de fermentación para el caso de bacterias y hongos. En el grupo de las bacterias dichos géneros están presentes en aguamiel, contrapunta y pulque mientras que en el caso de los hongos los géneros presentan un comportamiento dinámico. Se encontraron géneros presentes en aguamiel-contrapunta-pulque, aguamiel-pulque y aguamiel, pero ningún género observado sólo en pulque. Las dinámicas del género se presentan en la Tabla 23.

Genus	A	CP	P
<i>Sphingomonas</i>	+hg	+lw	+hg
<i>Acetobacter</i>	+lw	+hg	+lw
<i>Lactobacillus</i>	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	+hg	+md	+lw
<i>Acinetobacter</i>	+hg	+lw	+md
<i>Lactococcus</i>	+hg	+lw	+md
<i>Gluconobacter</i>	+md	+hg	+lw
<i>Serratia</i>	+hg	+lw	+md
<i>Gluconacetobacter</i>	+md	+hg	+lw

<i>Weissella</i>	+	+lw	+
<i>Penicillium</i>	+	-	-
<i>Candida</i>	+hg	?	?
<i>Kluyveromyces</i>	+	+	+
<i>Clavispora</i>	+hg	?	?
<i>Saccharomyces</i>	+	+	+
<i>Aureobasidium</i>	+hg	?	?
<i>Kazachstania</i>	+hg	?	?
<i>Dekkera</i>	+	+	-
<i>Torulaspora</i>	+	-	-
<i>Neophaeosphaeria</i>	+	-	-
<i>Cryptococcus</i>	+	-	-
<i>Pichia</i>	+	-	+lw
<i>Cladosporium</i>	+	-	-

Tabla 23- Géneros encontrados en aguamiel (A), contrapunta(CP) y pulque (P) (+ = observada, -= no observado,hg= abundancia alta, md= abundancia media, lw= abundancia baja, ?= dinámica no muy clara).

Discusión del papel biológico de los géneros microbianos más abundantes

Los géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Weissella*, *Sphingomonas* y *Acetobacter* fueron observados en aguamiel, contrapunta y pulque. *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* son microorganismos probióticos que pueden llevar a cabo fermentación. Especies de *Lactobacillus* han sido aislados de queso ricota, vegetales, leche fermentada, carne, pescado, pan, vino, aceitunas fermentadas, yogur y cacao (Dellaglio & Felis, 2005; De Vos et al., 1993; Gómez-Gil et al., 1998; Roh et al., 2010; Takeuchi et al., 1995). Especies del género *Leuconostoc* han sido encontradas en quesos, licores y alimentos fermentados como salchichas y vegetales, además tienen la capacidad de producir gomas y algunas bacteriocinas como mesentericina y leucocin (Buckenhiiskes, 1993; Caplice & Fitzgerald, 1999; Choi et al., 1999; Cogan & Jordan, 1994; Hechard et al., 1999; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004; Steinkraus, 1997). Especies de *Lactococcus* han sido observadas en el cultivo inicial de la fermentación de leche, además, se ha reportado que este este género

produce bacteriocinas como nisina, las cuales inhiben el crecimiento de un rango amplio de bacterias gram positivas (De Vos et al., 1993; Hirsch, 1953; Takeuchi et al., 1995; Vaughan-Martini et al., 2011; Vedamuthu & Neville, 1986). *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* son bacterias fermentativas, especies de *Gluconacetobacter* han sido aisladas de vinagre, frutas y rizosfera de plantas de café y kombucha mientras que especies de *Gluconobacter* han sido aisladas de comida fermentada tailandesa, vino de jerez y vinagre de cereales (Bulygina et al., 1992; Caro et al., 1998; Dufresne & Farnworth, 2000; Tamang et al., 2016; Yamada et al., 2012). *Acinetobacter* es una bacteria que contiene especies no fermentativas y fermentativas, las últimas usan la vía Entner-Doudoroff, estas han sido aisladas de productos fermentados como Kenkey, Koko y Chinkwangué (Bouvet & Grimont, 1986; Juni, 1978; Du Toit & Lambrechts, 2002; Tamang et al., 2016; Towner, 2006). Especies de *Serratia* producen actividad quitinolítica y un biosurfactante que puede actuar como un agente gelificante, especies de este género han sido aisladas de plantas como King Protea, hojas de tabaco, alfalfa, vegetales como coliflor, brócoli, lechuga, agua de mar y roedores pequeños (Gallois & Grimont, 1985; Grimont & Grimont, 2006; Fuchs et al., 1986; Joshi et al., 1989; Matsuyama et al., 1986). *Weissella* es un grupo de bacterias con metabolismo fermentativo obligado que han sido aisladas de distintos ambientes como del Pozol, *Weissella spp.* de Joetgal (platillo fermentado de corea), malta, *W. confusa* y *W. oryzae* encontrada en Boza no pasteurizada, *W. confusa* en leche masa fermentada, Suusac (leche fermentada de camello), Togwa (bebida fermentada de Tanzania), Bushera (bebida fermentada), Kulenaoto (leche fermentada), *W. ghanensis* en la fermentación de los granos de cacao, *W. hellenica* en Jian-gua (pepinos fermentados), *W. minor* en Gari (fermentado de cassava) (Ampe et al., 1999; De Bruyne et al., 2008; Isono et al., 2014; Jans et al., 2012; Kostinek et al., 2007; Mathara et al., 2004; Mugula et al., 2003; Muyanja et al., 2003; Oevelen et al., 1977; Osimani et al., 2015; Roh et al., 2010; Ulloa & Herrera, 1976). El género de *Sphingomonas* no es fermentativo y son reconocidas por producir exopolisacáridos que son gelificantes, especies de este género han sido aisladas de diferentes ambientes como raíces de árboles de manzana y durazno, fuentes de agua mineral de corea, agua marina (Lee et al., 2001; Lobas et al., 1992; Takeuchi et al., 1995; Vancanneyt et al., 2001). El género *Acetobacter* contiene bacterias que han sido encontradas en productos fermentados como vinos, cervezas, sake, sidra, té kombucha y Haipao (Asai & Shoda, 1958; Bernardo et al., 1998; Buchanan, 1970; Bulygina et al., 1992; Cleenwerck, 2002; Cleenwerck et al., 2008; Conner & Allgeier, 1976; Dufresne & Farnworth, 2000; Entani et al., 1985; Hu & Hao, 2004; Kozulis & Parsons, 1958; Yamada et al., 2012). Levaduras como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* son microorganismos que presentan actividad asesina contra especies del mismo género o contra *Candida albicans*, *Kloeckera apiculata*. Especies asesinas de *Saccharomyces* han sido identificadas como inhibidoras de cepas de inicio en la producción de bebidas alcohólicas como vino, cerveza, sake entre otras (Dufour et al., 2003; Estrada-Godina et al., 2001). Especies de *Kluyveromyces* han sido aisladas de suelos, insectos, frutas frescas, jamón, productos de panadería, vinos y cervezas lo que resulta en grandes niveles de diversidad metabólica y polimorfismos intraespecíficos, especies de este género como *K. marxianus* produce enzimas como la inulinasa,

dicha enzima tiene la habilidad de hidrolizar inulina, lo hidroliza a fructosa prácticamente pura (Barneti *et al.*, 1990; Comi & Cantoni, 1983; Silva-Santisteban *et al.*, 2006).

Géneros observados en aguamiel y pulque

Las levaduras *Kazachstania* y *Dekkera* sólo fueron observadas representativamente en aguamiel y pulque, ambas tienen la capacidad de fermentar y han sido descritos como microorganismos de descomposición (Imanishi *et al.*, 2007; Vaughan-Martini *et al.*, 2011). Especies de *Kazachstania* como lo es *K. gamospora* ha sido aislada de fuentes de comida, suelos de Japón, Sudáfrica y Tailandia, hojas caídas de árboles en Japón y alimentos fermentados en alimentos como el kefir (Imanishi *et al.*, 2007 ; Latorre-García *et al.*, 2007). Especies del género de *Dekkera* como *D. anomala* han sido encontrado en bebidas suaves y bebidas alcohólicas como vinos y cervezas (Chatonnet *et al.*, 1995; Henick-Kling *et al.*, 2000; Put & Henriette, 1976; Smith & Grinsven, 1984; Wydes *et al.*, 1997). Se ha reportado que especies de este género tienen un efecto positivo para producir un sabor característico de la cerveza y de Geuze ya que estas y otras levaduras de este género producen olores descritos como ahumado, plástico quemado (Oevelen *et al.*, 1977; Snowdon *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2007).

Géneros observados sólo en aguamiel

Los hongos *Penicillium*, *Torulaspota*, *Neophaeosphaeria*, *Cryptococcus* y *Pichia* sólo fueron observados en el aguamiel. *Penicillium* y *Torulaspota* son microorganismos que han sido identificado como promotores de procesos de descomposición de vegetales, quesos y carnes (Bonestroo *et al.*, 1993; Frisvad & Samson, 2004; Fröhlich-Wyder, 2003; Pitt, 1979). *Penicillium* es usado en la industria alimenticia, especialmente para la producción de quesos como Camembert o Roquefort y salchichas fermentadas; además especies de este género han sido aislado de productos como crema agria, cerveza, aceitunas, margarina, comida de mar, jaleas y jugos de manzanas (Barkai-Golan, 1974; Giraud *et al.*, 2010; Frisvad & Samson, 2004; Ismail & Zaky, 1999; Karahadian *et al.*, 1985; Lopez-Diaz *et al.*, 2001; Ludemann *et al.*, 2010; Nelson, 1970; Ockerman *et al.*, 2001; Pitt, 1979; Raper & Thom 1949; Snowdon, 1991; Thom, 1906). Especies de este género tiene la habilidad de utilizar creatina como fuente de carbono por lo que Frisvard y colaboradores sugieren que la habilidad de utilizar creatina indicativa que microorganismos de este género tienen habilidad de crecer en alimentos ricos en proteínas como lo es el pulque (Frisvad & Samson, 2004). Especies de *Torulaspota* han sido aisladas de suelo, uvas fermentadas, jugos de bayas, jugos de agave y cerveza (Lachance, 1995; Teoh *et al.*, 2004). *Pichia* y *Cryptococcus* tienen una baja capacidad fermentativa y han sido aislados de ambientes en descomposición y productos fermentados. Especies de *Pichia* han sido aisladas de cladodios de cactus en descomposición, papayas podridas en la india, jugos de frutas, además de animales y humanos (Bhadra *et al.*, 2007; Giobbe *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*,

1993; Henick-Kling *et al.*, 2000; Heras-Vázquez *et al.*, 2003; Phaff *et al.*, 1987). Especies del género *Cryptococcus* han sido aisladas de agua marina, suelos de la tundra y en la Antártida, superficies de uvas y aceitunas, involucradas en la pudrición de jamón y presentes sólo a principio de la fermentación de vinos y algunas especies han sido observadas en el proceso de fermentación de aceitunas (Fell, 1976; Fonseca *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2008; Gadanho *et al.*, 2003; Janisiewicz & Korsten, 2002; Milanovic *et al.*, 2013; Monte *et al.*, 1986; Nagahama, 2006; Nunez *et al.*, 1996; Valenčič *et al.*, 2010; Simoncini *et al.*, 2007; Shuang-Shi *et al.*, 2010; Milanovic *et al.*, 2013)

Discusión

Las técnicas con las que se ha explorado la diversidad de microorganismos presentes en el aguamiel y pulque han permitido observar a aquellos que pueden ser identificados mediante técnicas de microbiología clásica o por secuenciación de clonas. En este estudio, se muestra un panorama general de microorganismos cultivables y no cultivables en aguamiel, pulque y contrapunta, siendo la última la menos explorada hasta este estudio. Comparando el número de géneros microbianos observados en este trabajo con los reportados anteriormente se observó que nuestro estudio es tres órdenes de magnitud mayor para géneros bacterianos y cuatro para géneros de hongos, resultados de diversidad microbiana sin precedentes para el pulque. Los OTUs compartidos únicos en las muestras de aguamiel, contrapunta y pulque compartidos únicos y únicos como se muestran en el diagrama de Venn (Figura 42 y Figura 43) muestra que existen OTUs bacterianos y de hongos específicos de muestra y además que existen OTUS bacterianos y de hongos presentes en todo el proceso de fermentación. Para el caso de bacterias los OTUS más abundantes son los que se encuentran presentes en aguamiel, contrapunta y pulque, mientras que para los hongos no son los OTUS más abundantes los que están en todo el proceso de fermentación ya que estos presentan abundancias menores a 10 microorganismos observados.

La dinámica observada de los microorganismos ha sido ligada a los cambios fisicoquímicos del sistema por algunos investigadores como Adelfo Escalante. Como él lo menciona en su trabajo del 2016 estos cambios están íntimamente ligados a los recursos espacio-temporales y a las necesidades metabólicas de los microorganismos presentes, las características más observables dadas por estas dinámicas son incrementos o decrementos en las poblaciones de microorganismos. Cambios poblacionales de microorganismos se han observado en otros sistemas por ejemplo en los vinos, donde *Cryptococcus* sólo es observado al principio de la fermentación, pero no en etapas medias o finales de la fermentación (Milanovic *et al.*, 2013). Los resultados aquí obtenidos muestran que la diversidad de bacterias fue mayor que la de hongos, que el número de OTUs compartidos entre aguamiel y pulque tanto en el grupo de bacterias y hongos es mayor el observado y que las bacterias se encuentran a lo largo del proceso de fermentación mientras los hongos no, se sugiere

que esto puede ser debido a que bacterias producen metabolitos con actividad quitinolítica las cuales pueden estar regulando la presencia de hongos en el ambiente, un ejemplo reportado que produce dichos metabolitos son especies del género *Serratia*. Debido a que distintos microorganismos están interactuando en un nicho como lo es el pulque, resulta interesante descifrar el tipo de interacciones que pueden presentar los microorganismos ya que eso a algunos los pone en ventaja o desventaja ante la actividad o presencia de otros microorganismos.

A pesar que *Zymomonas mobilis* había sido definida como una especie esencial para el proceso de fermentación y debido a que en este estudio no se observó en ninguna muestra se sugiere que no es una especie esencial en el proceso de fermentación (Marroquín y colaboradores). Gran parte de los géneros de los microorganismos observados en este estudio durante el proceso de fermentación del pulque han sido descritos como microorganismos presentes en bebidas fermentadas e involucrados en proceso de descomposición de algunos productos. A lo largo del proceso de fermentación se encuentran microorganismos que son probióticos como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*. Algunos de estos como *Leuconostoc* producen gomas, las cuales pueden brindarle la consistencia al pulque (Choi *et al.*, 1999; Hechard *et al.*, 1999; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Algunas especies de *Leuconostoc* producen bacteriocinas como mesentericina y leucina y especies del género *Lactococcus* producen bacteriocinas como la nisina las cuales inhiben el crecimiento de diversas bacterias Gram positivas. Otras especies como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* presentan actividad asesina contra especies del mismo género u otros como *Candida* y *Kloeckera* (Dufour *et al.*, 2003; Estrada-Godina *et al.*, 2001). Además, algunas especies de *Serratia* producen actividad quitinolítica y produce un agente biosurfactante como especies de *Sphingomonas* las cuales pueden actuar como un agente gelificante siendo otro componente que puede dar la consistencia viscosa al pulque (Fuchs *et al.*, 1986; Joshi *et al.*, 1989; Matsuyama *et al.*, 1986). Otras características metabólicas importantes relacionadas a los microorganismos observados es la habilidad de especies como *Penicillium* los cuales tienen la habilidad de utilizar creatina como fuente de carbono por lo que Frisvard y colaboradores sugieren que tienen la habilidad de crecer en alimentos ricos en proteínas siendo el pulque un alimento rico en las mismas (Frisvad & Samson, 2004). A su vez algunas especies del género *Kluyveromyces* producen enzimas como inulinasa, esta tiene la habilidad de hidrolizar inulina la cual está presente en el aguamiel (Estrada-Godina *et al.*, 2001; Silva-Santisteban *et al.*, 2006), la hidroliza a fructosa y se ha reportado que microorganismos como *Gluconacetobacter*, *Wisella*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Candida* utilizan fructosa como fuente de carbono, por lo que la dinámica de la fermentación permite sobrevivir a microorganismos con base en las interacciones con otros y con base en la competencia de recursos.

Conclusiones

La evidencia histórico-geográfica muestra que el pulque ha existido desde tiempos prehispánicos en la zona llamada altiplanicie pulque, la cual está conformada por diversos municipios, entre estos Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala.

El pulque de Hidalgo representado por Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala es de alta calidad o tipo I con base en la clasificación de la norma del manejo a granel del pulque(NMX-V-037-1972).

Las características organolépticas (apariencia, textura, olor, y sabor) del pulque obtenidas en este estudio fueron consistentes y al comparar los resultados con otros estudios organolépticos se obtuvieron 10 atributos compartidos los cuales aquí se sugiere que son los que definen al pulque. Dichos atributos son: apariencia burbujeante, brillante y viscosa, con textura burbujeante y viscosa, con olor a agave y nota fermentada sabor ácido, con notas alcohólicas y fermentadas

Con las herramientas de secuenciación masiva de amplicones del gen 16S rRNA y de los ITS se logró observar 3 veces más géneros de bacterias y 4 veces más de géneros de hongos comparado con los descritos previamente en la literatura.

Las curvas de rarefacción muestran que los OTUs bacterianos y fúngicos en aguamiel contienen la mayor diversidad observada en el muestreo pero a pesar de ello aún existe diversidad de OTUs observable si se amplía el tamaño de muestra.

Los análisis de agrupamiento muestran que para el caso de los OTUs bacterianos si existe un claro agrupamiento entre muestras a diferencia de los OTUs fúngicos, los cuales se muestran dispersos en el espacio sin seguir un claro agrupamiento por muestra.

La diversidad alfa (observada, índices de Chao1, Shannon y Simpson) para los OTUs fúngicos en la mayoría de los casos fue observada en las muestras de pulque, mientras que para los OTUs bacterianos la diversidad observada y el índice de Chao1 son mayores en las muestras de aguamiel y el índice de Shannon y Simpson son mayores en contrapunta.

Las muestras de aguamiel fueron las que contenían el mayor número de OTUs bacterianos y fúngicos, seguidos de pulque y contrapunta con el menor número. Además se observó que el mayor número de OTUs bacterianos y fúngicos compartidos se observó entre las muestras de aguamiel y pulque.

Existen OTUs fúngicos y bacterianos que están presentes a lo largo del proceso de fermentación. Los OTUs bacterianos son algunos miembros de los más abundantes a diferencia de los OTUs fúngicos. Los OTUs bacterianos observados a lo largo del proceso de fermentación son : *Acinetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Halomicronema*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Marivita*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Weissella* y los OTUs fúngicos son: *Aureobasidium*, *Candida*, *Clavispora*, *Epicoccum*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*

Además, existen OTUs únicos en las muestras en aguamiel, contrapunta y pulque tanto bacterianos y fúngicos.

A pesar que especies como *Zymomonas mobilis* había sido reportado en la literatura como esenciales para la producción de pulque, en el presente estudio no se encontró el género *Zymomonas* por lo que se descarta su papel esencial en la producción del pulque.

Referencias

- Ampe, F., Moizan, C., Wachter, C., & Guyot, J. (1999). Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Asai, T., & Shoda, K. (1958). The taxonomy of *Acetobacter* and allied oxidative bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 4(4), 289-311.
- Aviña, J. C. (2010). Los pulques de Apan, tradiciones que se esconden entre restos de haciendas. . México: Aviare.
- Badillo, I. B. (2013). *Efecto del método de conservación del inóculo ("semilla") de pulque y de la concentración de carbohidratos en la fermentación del aguamiel*. UNAM.
- Bálint, M., Schmidt, P. A., Sharma, R., Thines, M., & Schmitt, I. (2014). An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and evolution*, 4(13), 2642-2653.
- Barkai-Golan, R. (1974). Species of *penicillium* causing decay of stored fruits and vegetables in israel. *Mycopathologia et Mycologia applicata*.
- Barneti, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1990). *Yeast: characteristics and identification* (2nd ed.): Cambridge, Cambridge University Press.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*.
- Bernardo, E. B., Neilan, B. A., & Couperwhite, I. (1998). Characterization, Differentiation and Identification of Wild-type Cellulose-synthesizing *Acetobacter* strains Involved in Nata de Coco Production. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(4), 599-608. doi: 10.1016/s0723-2020(98)80073-8
- Binder, M., & Hibbett, D. S. (2003). Oligonucleotides. from http://www2.clarku.edu/faculty/dhibbett/protocols_folder/primers/primers.htm
- Bhadra, B., Sreenivas Rao, R., Naveen Kumar, N., Chaturvedi, P., Sarkar, P. K., & Shivaji, S. (2007). *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., Caricaceae). *FEMS Yeast Res*, 7(4), 579-584. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00215.x
- Bonestroo, M., de Wit, J., Kusters, B., & Rombouts, F. (1993). Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. *International Journal of Food Microbiology*.
- Bouvet, P., & Grimont, P. (1986). Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter hemolyticus* sp.

- nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*.
- Buckenziiskes, H. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Buchanan, R. (1970). Review Of Asai's 19 34- 35 Contributions To The Taxonomy Of The Acetic Acid Bacteria. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*.
- Bulnes, F. (1909). *El pulque: estudio científico*: Antigua imprenta de Murguía.
- Bulygina, E., Gulikova, O., Dikanskaya, E., Etrusotva, A., Ova, T., & Chumako, K. (1992). Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *Journal of General Microbiology*.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*.
- Caporaso, J. G., Justin, K., Jesse, S., Kyle, B., Bushman, F. D., Costello, E. K., . . . Rob, K. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature*. doi: 10.1038/nmeth0510-335
- Caro, I., Palacios, V., & Pérez, L. (1998). Kinetic models for the acetic acid fermentation. *Recent Res Dev Biotechnol Bioeng*, 9.
- Cervantes-Contreras, M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficies y Vacío*, 20(30).
- Cervantes, M., & Pedroza, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Publicación científica en ciencias biomédicas*, 5(8), 1794-2470.
- Cleenwerck, I. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1551-1558. doi: 10.1099/ijs.0.02064-0
- Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2008). *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 9), 2180-2185. doi: 10.1099/ijs.0.65778-0
- Cogan, T., & Jordan, K. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria.
- Comi, G., & Cantoni, C. (1983). Yeasts in dry Parma hams *Industrie Alimentari*.
- CONABIO. (2013). México megadiverso [Press release]

- Conner, H. A., & Allgeier, R. J. (1976). Vinegar: Its History and Development. *20*, 81-133. doi: 10.1016/s0065-2164(08)70110-2
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics*, 265-270.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., & Boidron, J. N. (1995). The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*
- Chen, W., Hoy, J., & Schneider, R. (1992). Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Experimental Mycology*.
- Choi, H.-J., Lee, H.-S., S.Her, Oh, D.-H., & Yoon, S.-S. (1999). Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*.
- Chomczynski, P., Mackey, K., Drews, R., & Wilfinger, W. (1997). DNAzol (R): A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*, 22(3), 550-553.
- De Bruyne, K., Camu, N., Lefebvre, K., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2008). *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a *Ghanaian cocoa* fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 12), 2721-2725. doi: 10.1099/ijs.0.65853-0
- De León, J. M., Camacho, M., & Bourges, H. (2005). Amino acid composition of some Mexican foods. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 55, 172-186.
- De Vos, W. M., Mulders, J. W. M., Siezen, R. J., Hugenholtz, J., & Kuipers, O. P. (1993). Properties of Nisin Z and Distribution of Its Gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. *Applied And Environmental Microbiology*.
- Dellaglio, F., & Felis, G. E. (2005). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiol*.
- Dufour, J., Verstrepen, K., & Derdelinckx, G. (2003). Brewing yeast *Yeasts in Food*.
- DOF, (1972a) Hydromel. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- DOF, (1972b) Pulque manejado a granel. Pulque handled in bulk. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*.
- Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., & Suzuki, A. K.-I. (1985). *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *J. Gen. App. Microbiol*.

- Erlwein, S., Mira, J., & Velasco, A. (2015). Proceso de elaboración de pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo. *Escuela Nacional de Antropología e Historia*.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel Flores, G., Matus Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque fermentation. *Handb. Plant-Based Fermented Food Beverage Technol., Second Edition*. CRC Press, Boca Raton, FL, 691-706.
- Escalante, A., Lopez Soto, D. R., Velazquez Gutierrez, J. E., Giles-Gomez, M., Bolivar, F., & Lopez-Munguia, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Front Microbiol*, 7, 1026. doi: 10.3389/fmicb.2016.01026
- Escalante, A., Rodriguez, M. E., Martinez, A., Lopez-Munguia, A., Bolivar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 235(2), 273-279. doi: 10.1016/j.femsle.2004.04.045
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de Leon, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet*, 6, 348. doi: 10.3389/fgene.2015.00348
- Estrada-Godina, A., Cruz-Guerrero, A., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M., & Gómez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17.
- Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M., & Gómez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Eva, B., Tor, C., Christian, B., Eric, C., Pierre, T., & Håvard, K. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*.
- Fakruddin, M., & Mannan, K. (2013). Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 42(1).
- Fell, J. (1976). Yeasts in oceanic regions. *Recent Advances in Aquatic Mycology*. EB Gareth Jones. ed.
- Flores M. Areli, ME, O. H., & S., M. C. (1996). Obtención de una miel a partir de aguamiel producido por tres especies de *Agave* spp que se cultivan en el estado de Tlaxcala y su evaluación físico - química en su composición. *XXVII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Monterrey N.L. México.

- Flores, M. A., Coyotl, H. J., Hernández, T. M., Velásquez, J. L., & Hernández, A. (2006). Gestión de calidad de una miel obtenida a partir de aguamiel pulquero (Agave salmiana).
- Fonseca, Á., Boekhout, T., & W., J. (2008). Validation of the basidiomycetous yeast species *Cryptococcus flavus* and *C. liquefaciens*. *Mycotaxon.*, 106.
- Fonseca, Á., Scorzett, G., & Fell, J. W. (1999). Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 337-359. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies In Mycology*.
- Fröhlich-Wyder, M. T. (2003). Yeasts in dairy products. *Yeasts in Foods: Beneficial and Detrimental Aspects* (pp. 209-237).
- Fuchs, R. L., Mcpherson, S. A., & Drahos, D. J. (1986). Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase. *Applied And Environmental Microbiology*.
- Gadanho, M., Almeida, J., & Sampaio, J. P. (2003). Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Gallois, A., & Grimont, P. A. (1985). Pyrazines responsible for the potatolike odor produced by some *Serratia* and *Cedecea* strains. *Applied And Environmental Microbiology.*, 50(4), 1048-1051.
- García-Garibay, M., López, A., Quintero, R., & Lopéz-Munguia, C. (2004). Biotecnología alimentaria, editorial Limusa. *México, DF, pag, 455*.
- García-Mendoza, A. (1992). Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de agavaceas y nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. México, D.F. *Jardín Botánico Instituto de Biología UNAM*.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
- Gentry, R. P. (1982). El maguey: árbol de las maravilla. . . *Editado por el Museo Nacional de Culturas Populares. México, D. F.*
- Giobbe, S., Marceddu, S., Scherm, B., Zara, G., Mazzarello, V. L., Budroni, M., & Migheli, Q. (2007). The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*,

- which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Res*, 7(8), 1389-1398. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00301.x
- Giovannucci, D., Josling, T., Kerr, W., O'Connor, B., & Yeung, M. T. (2009). *Guide To Geographical Indications*.
- Giraud, F., Giraud, T., Aguilera, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., . . . Dupont, J. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *Int J Food Microbiol*, 137(2-3), 204-213. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J., & Inglis, V. (1998). A review on the use of microorganisms as probiotics. *Rev Latinoam Microbiol*.
- Gonçalves de Lima, O. (1990). *Pulque, balché y pajuaru*: Fondo de Cultura Económica, Mexico.
- Gonzalez, M. J. F., P. Garcia Garcia, A., Fernandez, G., & Quintana, M. C. D. (1993). Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*.
- Gotelli, N. J., & Chao, A. (2013). Measuring and estimating species richness, species diversity, and biotic similarity from sampling data.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. (2006). The genus *Serratia* *The prokaryotes* (pp. 219-244): Springer.
- Guerrero-Bustamante, R. (2016). La producción magueyera-pulquera en el altiplano hidalguense. *Prometeo*.
- Guerrero Guerrero, R. (1980). El pulque. *México: SEPINAH*.
- Head, I., Saunders, J., & Pickup, R. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35(1), 1-21.
- Hechard, Y., Berjeaud, J.-M., & Cenatiempo, Y. (1999). Characterization of the *mesB* Gene and Expression of Bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Current Microbiology*, 39.
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.10.005
- Henick-Kling, T., Egli, C., Licker, J., Mittrakul, C., & Acree, T. E. (2000). *Brettanomyces* in wine *Proc. 5th Int. Symp. Cool Climate Viticulture and Oenology, Melbourne, Australia*.
- Heras-Vazquez, L., Javier, F., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J. M., & Rodriguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and

- juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS yeast research*, 3(1), 3-9.
- Hernández Ramos, L., & Esparza Torres, F. (2012). Control del oscurecimiento no enzimático en miel de maguey (*Agave mapisaga*). In T. d. I. e. A. U. A. C. E. d. M. p (Ed.).
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., & Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 1-11.
- Hirsch, A. (1953). The Evolution Of The Lactic Streptococci. *J. Dairy Res.*
- Hu, H., & Hao, L. (2004). Separation and identification of dominant *Acetobacter* spp. from Shanxi aged vinegar. *J Shanxi Agric Univ.*
- Hu, Y. (2017). *Microbial DNA Sequencing in Environmental Studies*. KTH Royal Institute of Technology.
- Huson DH, A. A., Qi J, Schuster SC. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res*, 17(3).
- Imanishi, Y., Ueda-Nishimura, K., & Mikata, K. (2007). Two new species of *Kazachstania* that form ascospores connected by a belt-like intersporal body: *Kazachstania zonata* and *Kazachstania gamospora*. *FEMS Yeast Res*, 7(2), 330-338. doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00163.x
- IMPI. (2016). *Denominaciones de origen. Orgullo de México*
- INEGI. (2014). Anuario estadístico y geográfico de Hidalgo
- Ismail, M., & Zaky, Z. (1999). Evaluation of the mycological status of luncheon meat with special reference to aflatoxigenic moulds and aflatoxin residues. *Mycopathologia*, 146(3), 147-154.
- Isono, Y., Shingu, I., & Shimizu, S. (2014). Identification and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Masai Fermented Milk in Northern Tanzania. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(4), 660-664. doi: 10.1271/bbb.58.660
- Ivan Ilich [Nombre de usuario]. (2015, Junio 21). "Capado" de maguey pulquero. REINU - BUAP. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=S6Q4tkePQvk>
- James, F. C., & Rathbun, S. (1981). Rarefaction, relative abundance, and diversity of avian communities. In 98 (Ed.), *The Auk*
- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol*, 40, 411-441. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158

- Jans, C., Bugnard, J., Njage, P. M. K., Lacroix, C., & Meile, L. (2012). Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health-threatening predominant microflora. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 371-379. doi: 10.1016/j.lwt.2012.01.034
- Joshi, S., Kozłowski, M., Richens, S., & Comberbach, D. M. (1989). Chitinase and chitobiase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.*
- Juni, E. (1978). Genetics And Physiology Of *Acinetobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.*
- Juste, A., Malfliet, S., Waud, M., Crauwels, S., De Cooman, L., Aerts, G., . . . Lievens, B. (2014). Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. *Food Microbiol*, 39, 39-46. doi: 10.1016/j.fm.2013.10.010
- Karahadian, C., Josephson, D. B., & Lindsay, R. C. (1985). Volatile Compounds from *Penicillium* sp. Contributing Musty-Earthy Notes to Brie and Camembert Cheese Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Pinto, C., Egounlety, M., Sossa, C., . . . Holzapfel, W. H. (2007). Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int J Food Microbiol*, 114(3), 342-351. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.029
- Kozulis, J. A., & Parsons, R. H. (1958). *Acetobacter alcoholophilus* n. sp. - a new species isolated from storage beer. *J Inst Brew.*
- Lachance, M.-A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non distilled and distilled Agave beverages. *FEMS yeast research*.
- Latorre-García, L., del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 785-791. doi: 10.1007/s11274-006-9298-y
- Lee, J.-S., Pyun, Y.-R., Shin, Y. K., & Park, Y.-H. (2001). *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov. and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

- Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*.
- León-de la O, D. I., Méndez-Colín, D. S., Rodríguez-Padilla, D. P., Puente-Hurle, L., García-Sorrondegui, F. I., & Salgado-Brito, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*.
- Lobas, D., Schumpe, S., & Deckwer, W.-D. (1992). The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314). *Applied Microbiology Biotechnology*.
- Lopez-Diaz, T. M., Santos, J. A., Maria Luisa Garcia-Lopez, & Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*.
- López, A., García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., & López-Munguía Canales, A. (2004). Impacto de la biotecnología en la nutrición. *Biotecnología Alimentaria*, 5ª ed (Grupo Noriega editores) Ed Limusa, México, 125-153.
- Loyola-Montemayor, E. (1956). La industria del pulque. cultivo y explotación del maguey, elaboración, transporte y comercio del pulque, aspectos fiscales, diversificación industrial, reseña histórica, estadísticas, patentes, reglamentación federal, bibliografía. .
- Ludemann, V., Greco, M., Rodríguez, M. P., Basílico, J. C., & Pardo, A. G. (2010). Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 315-318. doi: 10.1016/j.lwt.2009.07.011
- Macedo, E. (1950). Manual del magueyero. *Ediciones Agrícolas Trucco. México*.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 387-402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- Massieu, G., Cravioto, R., Guzmán, J., & Olivera, H. (1959). Contribución adicional al estudio de la composición de alimentos Mexicanos. *Ciencia, México*, 19, 53-66.
- Massieu, G. H., Guzmán, J., Cravioto, R. O., & Calvo, J. (1949). Determination of some essential amino acids in several uncooked and cooked Mexican foodstuffs. *Journal of Nutrition*, 38(293-304).
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., & Holzapfel, W. H. (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int J Food Microbiol*, 94(3), 269-278. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.008

- Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S., & Yano, I. (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *Journal of General Microbiology*.
- Milanovic, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *Int J Food Microbiol*, 161(3), 240-246. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019
- Monte, E., Villanueva, J., & Dominguez, A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *International Journal of Food Microbiology*, 3(6), 355-359.
- Monterrubio, A. L. (2007). *Las haciendas pulqueras de México* (Vol. 35): UNAM.
- Morgan, J., & Blair, D. (1995). Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group *Parasitology*.
- Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A., & Sørhaug, T. (2003). Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 187-199. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00141-1
- Musters, W., K. Boon, C. A. F. M. Van Der Sande, H. Van Heerikhuizen, R. J. Planta. (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBOJ*, 9.
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J., & Langsrud, T. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 201-210. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00148-4
- Nagahama, T. (2006). Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 241-262.).
- Nelson, J. H. (1970). Production of Blue Cheese Flavor via Submerged Fermentation by *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Nilakanta, H., Drews, K. L., Firrell, S., Foulkes, M. A., & Jablonski, K. A. (2014). A review of software for analyzing molecular sequences. *BMC Research Notes*.
- Núñez, F., Rodríguez, M., Córdoba, J., Bermúdez, M., & Asensio, M. (1996). Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2-3), 271-280.
- Ockerman, H., Sánchez, F. C., Mariscal, M. O., Serrano, A. M., Muñoz, M. T., & León-Crespo, F. (2001). Influence of temperature on proteolytic activity of indigenous Spanish molds in meat products. *Journal of Muscle Foods*, 12(4), 263-273.

- Oevelen, D. V., Spaepen, M., Timmermans, P., & Verachtert, H. (1977). Microbiological Aspects Of Spontaneous Wort Fermentation In The Production Of Lambic And Gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*.
- OMPI, (1958) Arreglo de Lisboa relativo a la Protección de las Denominaciones de Origen y su Registro Internacional.
- Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanoviæ, V., & Clementi, F. (2015). Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *Int.J. Food Microbiological reviews*.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G. A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., . . . Iliopoulos, I. (2015). Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights*, 9, 75-88. doi: 10.4137/BBI.S12462
- Parasonare Bowls. (2011, Abril 18). Capando el Maguey. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=abJZ1YwnwzA>
- Pepito Griyo (2013, Diciembre 23). TINACALES DE PULKE [Archivo de video]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=2VwwZaZAAOY>
- Phaff, H. J., Starmer, W. T., Tredick-Kline, J., & Aberdeen, V. (1987). *Pichia barkeri*, a new yeast species occurring in necrotic tissue of *Opuntia stricta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 386-390.
- Pitt, J. I. (1979). *Penicillium crustosum* and *P. simplicissimum*, the correct names for two common species producing tremorgenic mycotoxins. *Mycologia*, 1166-1177.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8).
- Put, J., & Henriette, M. (1976). Heat Resistance Studies on Yeast spp. Causing Spoilage in Soft Drinks. *J. appl. Bact.*
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., . . . Glockner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D590-596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*, 12, 38. doi: 10.1186/1471-2105-12-38
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 62(2), 142-160. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x

- Ramírez, A. (2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (Agave salmiana) en *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Maestra en ciencias en bioprocesos), Instituto Politécnico Nacional
- Ramírez, J. F., Sánchez-Marroquín, A., Álvarez, M., Valyasevi, R., & . (2004). *Industrialization of Mexican pulque in Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Steinkraus.
- Raper, K., & Thom, C. (1949). *A manual of the penicillia*: The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Rivas-Hilario, C. (2014). *Desarrollo del perfil sensorial del pulque muestras: tradicionales y experimentales* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(4).
- Roh, S. W., Kim, K. H., Nam, Y. D., Chang, H. W., Park, E. J., & Bae, J. W. (2010). Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISMEJ*.
- Saint-Eve, A., Déléris, I., Panouillé, M., Dakowski, F., Cordelle, S., Schlich, P., & Souchon, I. (2011). How texture influences aroma and taste perception over time in candies. *Chemosensory Perception*, 4(1-2), 32-41.
- Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 4(4), 217-226. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8
- Sanchez-marroquin, A., & Hope, P. H. (1953). Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Agricultural and food chemistry*, 1(3).
- Sánchez-Marroquín, A., Terán, J., & Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque.-XVIII.-Datos químicos de la fermentación de aguamiel con cultivos puros. *Rev. Soc. Quím. México*, 1, 167-174.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Schlötterer C, Hauser Marie-Theres, von, H. A., & Diethard, T. (1994). Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in Drosophila. *Mol. Biol. Evol.*, 11(3).
- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental microbiology*, 14(1), 4-12.

- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci*, 5, 209. doi: 10.3389/fpls.2014.00209
- Shuang-Shi, L., Chao, C., Zheng, L., Jing-Yu, C., Yan, B., Han, B.-Z., & Malcolm, R. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol*, 138(1-2), 85-90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009
- Silva-Santisteban, O. Y., Converti, A., & Filho, F. M. (2006). Intrinsic Activity of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and Carbon and Nitrogen Balances. *Food Technology and Biotechnology*.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., & Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiol*, 24(6), 577-584. doi: 10.1016/j.fm.2007.01.003
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature*.
- Smith, M. T., & Grinsven, A. M. V. (1984). *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Snowdon, A. (1991). A Colour Atlas of post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables Vol. 2. Wolfe Scientific Ltd. London 302Pp.
- Snowdon, E. M., Bowyer, M. C., Grbin, P. R., & Bowyer, P. K. (2006). Mousy Off-Flavor: A Review. *J.Agric.FoodChem*.
- Srivathsan, A., Sha, J. C., Vogler, A. P., & Meier, R. (2014). Comparing the effectiveness of metagenomics and metabarcoding for diet analysis of a leaf-feeding monkey (*Pygathrix nemaeus*). *Mol Ecol Resour*, 15(2), 250-261. doi: 10.1111/1755-0998.12302
- Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*.
- Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in World Food Processing. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 1.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102(1), 10-21. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.030
- Swings, J., & Ley, J. D. (1977). The Biology of Zymomonas. *Bacteriological Reviews*.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*.
- Takeuchi, M., Sakane, T., Yanagi, M., Yamasato, K., Hamana, K., & Yokota, A. (1995). Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Plants: Proposal of *Sphingomonas*

- rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol*, 7, 377. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., . . . Abarenkov, K. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycKeys*, 10, 1-43. doi: 10.3897/mycokeys.10.4852
- Teoh, A. L., Heard, G., & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol*, 95(2), 119-126. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020
- Thom, C. (1906). Fungi in cheese ripening: Camembert and Roquefort. *Department of Agriculture*.
- Towner, K. (2006). The genus *Acinetobacter* *Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria Proteobacteria: gamma subclass* (Vol. 6, pp. 746-758): Springer.
- Ulloa, M., & Herrera, T. (1976). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *An. Inst. Biol. UNAM*(47), 145-163.
- Valenčič, V., Mavsar, D., Bučar-Milkavkavčič, Butinar, B., Čadež, N., Golob, T., . . . Možina, S. (2010). The Impact of Production Technology on the Growth of Indigenous Microflora and Quality of Table Olives from Slovenian Istria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3).
- Van Der Sande, C. A., Kwa, M., Van Nues, R. W., Van Heerimuizen, H., Raué, H. A., & Planta, R. J. (1992). Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Molecular Biology*.
- Vancanneyt, M., Gottschal, J. C., Schut, F., Snauwaert, C., Goris, J., & Swings, J. (2001). *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Vaughan-Martini, A., Lachance, M.-A., & Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 34 - Kazachstania Zubkova (1971) *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 439-470). London: Elsevier.
- Vázquez, M., Luna, F., & Portes, L. (2011). Primera cata de pulques MENTHI RA SEI en Ixmiquilpan. Retrieved 12 febrero 2016, from <http://www.sinembargo.mx/10-12-2011/92162>

- Vedamuthu, E. R., & Neville, J. M. (1986). Involvement of a Plasmid in Production of Ropiness (Mucoidness) in Milk Cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Applied And Environmental Microbiology*.
- Vela, E. (2014). Breve historia: El Maguey. *Arqueología mexicana*, 10-11.
- Vera, S. A., & Georgina, M. (1976). Estudio de productos industriales derivados del maguey.
- Weisburg, W., Burns, S., Pelletier, D., & Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*.
- Woese, C. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2).
- Wydes, M., Spillmann, H., & Puhán, Z. (1997). Investigation of the yeast flora in dairy products: a case study of kefir. *Food Technology and biotechnology*, 35, 299-304.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., & Nakagawa, Y. (2012). Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. *Annals of Microbiology*, 62(2), 849-859. doi: 10.1007/s13213-011-0288-4
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., . . . Rossello-Mora, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*, 12(9), 635-645. doi: 10.1038/nrmicro3330

Anexo

Cuestionario empleado para obtener el perfil sensorial del pulque

Perfil sensorial del pulque

Instrucciones:

Ante usted se presentará 1 muestra de pulque, deberá evaluar los tributos que presenta. En el cuestionario se presentan cuatro aspectos a evaluar que son apariencia, textura, olor y sabor. En cada categoría deberá evaluar la intensidad de cada característica, los valores que toma la intensidad van de 0-9. Donde 0 representa que no está presente esa característica y 9 representa "el grado más intenso".

Nombre de la persona que realizó la evaluación sensorial:

Edad:

Pulque proveniente del municipio de

Apariencia:

Burbujeante	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Turbidez	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Viscoso	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Grumoso	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Precipitado	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Brillante	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Olor:

Ácido	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota alcohólica	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota fermentada	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Agave	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Madera	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Amargo	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota láctea	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota brócoli	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Aceitoso	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Atún	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Textura:

Viscoso	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Burbujeante	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Uniformidad	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Grumosidad	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Sabor:

Ácido	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota alcohólica	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Amargo	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Astringente	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Nota fermentado	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Aguamiel	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Resabio amargo	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Notal fresco	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figura A1- Formato del cuestionario empleado en Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala para obtener el perfil sensorial del pulque.

Glosario

Burbujeante: producción de de burbujas en la bebida.

Turbidez: presencia partículas extrañas, es decir aquellas que pueden apreciarse como basura o restos de alguna cosa que no pertenece a la bebida.

Viscoso: que presenta una textura pegajosa.

Grumoso: presenta cosas compactadas formando cúmulos visibles en la bebida.

Precipitado: cuando el líquido se separa en fases visibles, es decir cuando la bebida se precipita.

Uniforme: no parece tener partículas visibles en la bebida, ni diferentes tonalidades.

Nota alcohólica: presencia de un sabor a alcohol.

Nota fermentado: el sabor y olor a fermentado que presenta la bebida.

Nota láctea: que presenta un ligero sabor a leche o sus derivados.

Nota brócoli: presencia de un ligero olor a brócoli.

Aceitoso: ligero olor a algún producto aceitoso.

Astringente: con un fuerte sabor amargo y fresco a la vez se caracteriza por dejar una sensación de frescura (así como los enjuagues bucales).

Resabio amargo: sabor amargo que resulta desagradable.

Notal fresco: que presenta un sabor fresco.

Figura A2- **Glosario complementario al cuestionario empleado para tener homogeneidad en los distintos conceptos.**

Tabla con los valores de los atributos del pulque obtenidos por municipio.

Atributos	Epazoyucan							Tepeapulco							Zempoala						
Apariencia																					
Burbujeante	0	2	0	1	0	0	1	2	7	9	7	7	6	9	1	0	1	2	1	1	
Turbidez	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Viscoso	4	6	6	8	6	5	5	7	1	8	9	7	8	7	6	7	4	6	7	8	
Grumoso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
Precipitado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	
Brillante	0	1	0	1	0	0	2	0	8	8	8	7	9	7	0	0	0	0	1	0	
Textura																					
Viscoso	5	7	6	7	6	5	6	7	8	9	7	8	8	7	6	6	5	6	6	7	
Burbujeante	0	0	1	1	3	0	0	0	9	5	7	3	6	8	1	0	1	1	1	1	
Uniformidad	8	8	9	9	9	9	8	8	8	9	8	8	9	9	7	8	9	9	8	9	
Grumosidad	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Sabor																					
Ácido	1	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	2	0	2	
Nota alcohólica	0	0	1	0	0	0	0	1	7	2	6	5	4	5	1	0	0	0	0	1	
Amargo	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0	
Astringente	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Nota fermentada	0	1	1	0	2	1	1	0	1	6	5	5	7	5	0	1	0	0	0	2	
Aguamiel	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
Resabio amargo	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
Notal fresco	5	3	2	2	2	9	0	4	3	9	9	9	9	8	2	2	5	4	5	8	
Olor																					
Ácido	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	
Nota alcohólica	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	3	0	0	2	2	0	
Nota fermentada	9	8	8	7	8	9	9	8	1	3	2	2	0	3	8	7	8	6	8	8	
Agave	3	8	8	8	9	9	7	4	6	8	9	4	8	3	8	8	8	7	8	7	
Madera	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	
Amargo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
Nota láctea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Nota brócoli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aceitoso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atún	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla A1- Resultados de la evaluación del perfil sensorial por municipio.