



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**OZONIZACIÓN PARA LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA, CALIDAD
FISICOQUÍMICA Y NUTRACÉUTICA DE AGUAMIEL DE *Agave*
*salmiana***

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

Presenta:

ALEJANDRA CRISTINA CORONA PÉREZ

Bajo la supervisión de: **José Joel Enrique Corrales García, Dr.**



Chapingo, Estado de México, noviembre de 2021



APROBADA



**OZONIZACIÓN PARA LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA, CALIDAD
FISICOQUÍMICA Y NUTRACÉUTICA DE AGUAMIEL DE *Agave salmiana***

Tesis realizada por **ALEJANDRA CRISTINA CORONA PÉREZ**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:


Dr. José Joel Enrique Corrales García

ASESOR:


Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada

ASESOR:


Dra. Lyzbeth Hernández Ramos

Chapingo, Texcoco Estado de México, noviembre 2021.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
DEDICATORIAS.....	xi
AGRADECIMIENTOS.....	xii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xiv
RESUMEN GENERAL.....	xv
GENERAL ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. OBJETIVOS.....	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Hipótesis	5
3. REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1. Familia <i>Agavaceae</i>	6
3.1.1. Género <i>Agave</i> : clasificación y distribución	6
3.2. Agaves pulqueros	7
3.2.1. Producción de <i>Agave salmiana</i>	7
3.2.2. Usos y aprovechamiento	8
3.3. Aguamiel.....	8
3.3.1. Proceso de obtención.....	9
3.3.2. Componentes químicos del aguamiel.....	9
3.3.3. Importancia nutricional	9

3.3.4.	Importancia nutracéutica	10
3.3.5.	Capacidad antioxidante	11
3.3.6.	Compuestos fenólicos totales.....	12
3.3.7.	Microbiota del aguamiel	13
3.3.8.	Producción de etanol en aguamiel	14
3.4.	Tecnologías para la preservación de alimentos	15
3.4.1.	Ozono	16
3.4.2.	Características del ozono	16
3.4.3.	Formación del ozono	17
3.4.4.	Descomposición del ozono.....	17
3.5.	El ozono en la industria alimentaria	17
3.6.	Inactivación de microorganismos por ozono	18
3.7.	El pH y el efecto del ozono	22
3.8.	Efecto del ozono sobre compuestos bioactivos	23
3.9.	Literatura citada	25
4.	COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA EL RECuento DE MESÓFILOS AEROBIOS, COLIFORMES Y LEVADURAS EN AGUAMIEL.....	39
4.1.	Resumen	39
4.2.	Introducción	40
4.3.	Materiales y métodos.....	41
4.3.1.	Material vegetal	41
4.4.	Planeación experimental.....	42
4.5.	Resultados y discusión	47
4.6.	Conclusiones	53
4.7.	Literatura citada	54

5. EFECTO DEL OZONO SOBRE LA POBLACIÓN TOTAL DE MICROORGANISMOS Y PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN AGUAMIEL.	58
5.1. Resumen	58
5.2. Introducción	59
5.3. Materiales y métodos.....	60
5.3.1. Material vegetal.....	60
5.4. Planeación experimental.....	60
5.4.1. Aplicación de ozono	61
5.4.2. Recuento de la población total de microorganismos en aguamiel.	61
5.4.3. Variables fisicoquímicas	62
5.5. Resultados y discusión	62
Efecto del ozono sobre la población total de microorganismos	62
Parámetros fisicoquímicos	65
5.6. Conclusión.....	68
5.7. Literatura citada	68
6. IMPACTO DE LA APLICACIÓN DE OZONO PARA LA VIDA DE ANAQUEL DE AGUAMIEL.	71
6.1. Resumen	71
6.2. Introducción	72
6.3. Materiales y métodos.....	73
6.3.1. Material vegetal.....	73
6.4. Planeación experimental.....	73
6.4.1. Aplicación de ozono	74
6.4.2. Recuento de la población total de microorganismos en aguamiel.	74
6.4.3. Variables fisicoquímicas	75
6.4.4. Variables nutracéuticas	75
6.5. Resultados y discusión	77

Población total de microorganismos	77
Células viables	78
Acidez titulable	79
Sólidos solubles totales (SST).....	80
pH	81
Cuantificación de etanol	82
Compuestos fenólicos solubles totales.....	84
Actividad antioxidante.	85
Cuantificación de etanol	88
6.6. Conclusión.....	91
6.7. Literatura citada	92
7. CONCLUSIONES GENERALES	97

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de ozono sobre los microorganismos en diferentes productos líquidos.	21
Cuadro 2. Composición química de las palcas 3M-Petrefilm®, Coliformes totales (CC), Levaduras totales (YM) y Mesófilos aerobios totales (AC).	44
Cuadro 3. Condiciones de temperatura y tiempo para la incubación de microorganismos en placas 3M-Petrefilm®.....	45
Cuadro 4. Composición de los medios utilizados en el método tradicional, CT: AVR B (agar bilis y rojo violeta), LT: PDA (agar papa dextrosa) y MAT: PCA (agar para métodos estándar).....	46
Cuadro 5. Condiciones de temperatura y tiempo para la incubación de microorganismos en placas Petri.	46
Cuadro 6. Parámetros de correlación y equivalencia entre el método 3M-Petrefilm® y método convencional para el recuento de microorganismos en aguamiel.	48
Cuadro 7. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: bacterias ácido-lácticas (BAL), mesófilos aerobios totales (MAT), y porcentajes de reducción microbiológica en aguamiel con diferentes tiempos de ozono.....	65
Cuadro 8. Promedios y desviaciones estándares del contenido de sólidos solubles y pH de aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo exposición de ozono.....	67
Cuadro 9. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: Bacterias ácido-lácticas (BAL) y Levaduras totales (LT) en aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo exposición de ozono.	79

Cuadro 10. Cambios en la población total de microorganismos (PTM) en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.	86
Cuadro 11. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: bacterias ácido-lácticas (BAL), levaduras totales (LT) presentes en aguamiel reozonizado.	87
Cuadro 12. Cambios en los valores de pH, contenido de SST y producción de acidez en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.	88
Cuadro 13. Porcentaje de producción de etanol obtenido en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.	88
Cuadro 14. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales (CF) y actividad antioxidante (ABTS y FRAP) en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación de ozono y destrucción de microorganismos mediante ozono.....	20
Figura 2. Mecanismo de acción del ozono según el pH	22
Figura 3. Comparación del crecimiento de mesófilos totales en Petrifilm AC: dilución 10^{-5} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b): dilución 10^{-3} (b).	49
Figura 4. Comparación del crecimiento de coliformes totales en Petrifilm EC: dilución 10^{-4} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b).....	50
Figura 5. Regresión lineal de los recuentos de mesófilos aerobios totales (a), coliformes totales (b) y levaduras totales (c) obtenidos en 3M- Petrifilm® y método convencional.	52
Figura 6. Comparación del crecimiento de levaduras totales en Petrifilm YM: dilución 10^{-4} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b).....	53
Figura 7. Visualización de microorganismos en la Cámara Neubauer, al microscopio óptico 100x. <i>Levaduras</i> (A), Bacterias ácido-lácticas (B) y (C) <i>Leuconostoc</i>	63
Figura 8. Población total de microorganismos ($\log_{10}\text{mL}^{-1}$) en aguamiel de <i>A. salmiana</i> tratada con diferentes niveles de ozonización: (0, 3, 6, 9 y 12 min) y analizada en diferentes tiempos de almacenamiento (0, 4, 8 y 12 h).	64
Figura 9. Cambios de la población total de microorganismos ($\log_{10} \text{mL}^{-1}$) en aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo de ozonizado a lo largo de 48 h de almacenamiento.....	78
Figura 10. Producción de g /L de ácido láctico en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono.	80
Figura 11. Concentración de sólidos solubles totales (°Bx) en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel	

de <i>A. salmiana</i>	81
Figura 12. Valores de pH en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel de <i>A. salmiana</i>	82
Figura 13. Producción de % de etanol (v/v) tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel de <i>A. salmiana</i>	83
Figura 14. Concentración de compuestos fenólicos (mg EAG/100 mL de aguamiel) en aguamiel ozonizada.	84
Figura 15. Cambios en la actividad antioxidante ($\mu\text{m ET} / 100 \text{ mL}$ de aguamiel) en aguamiel de <i>A. salmiana</i> ozonizada.....	85

DEDICATORIAS

A mis padres por su paciencia, enseñanza, sacrificios y apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo.

A cada uno de mis hermanos, por su solidaridad y comprensión.

A cada una de mis abuelitas por sus sabios consejos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias por darme la salud y sabiduría para concluir este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber financiado mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de seguir desarrollándome profesionalmente y darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida profesional.

A la **Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada** por el gran apoyo otorgado para la realización de esta investigación, así como por su orientación, enseñanza y consejos.

A la **Dra. Lyzbeth Hernández Ramos** por su paciencia y ayuda invaluable en la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. Joel Corrales García** por su confianza, paciencia otorgada y por compartir sus conocimientos durante la realización de este trabajo de investigación.

A la **Dra. Rosario García Mateos** por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

A los profesores de microbiología: **M.C. Salvador Martínez Romero** y al **Q.F.B. Adalberto Gómez Cruz** por la asesoría y apoyo brindando durante el desarrollo de este trabajo.

Al **I.B.Q. Félix Esparza Torres** por su valiosa disposición y ayuda para lograr los objetivos de esta investigación.

A la **Dra. Diana Becerra Morales** por la asesoría brindada en el uso del cromatógrafo de gases.

A cada uno de los **productores** de aguamiel por la buena disposición y ayuda en la obtención de materia prima (aguamiel).

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Alejandra Cristina Corona Pérez
Fecha de nacimiento	08 de enero de 1995
Lugar de nacimiento	Texcoco, México.
CURP	COPA950108MMCRRL02
Profesión	Ingeniero Agroindustrial
Cédula Profesional	08764282
Desarrollo académico	
Licenciatura (2014-2018)	Ingeniería Agroindustrial Universidad Autónoma Chapingo
Maestría (2019-2021)	Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

Ozonización para la estabilidad microbiológica, calidad fisicoquímica y nutracéutica de aguamiel de *Agave salmiana*

La savia de *A. salmiana* (aguamiel) cuenta con atributos nutricionales, nutracéuticos y alto contenido de carbohidratos, que permiten el desarrollo de un consorcio de microorganismos y hace esta bebida altamente perecedera. El uso de tecnologías emergentes ha mostrado la disminución de microorganismos y preservación de compuestos bioactivos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y nutracéutica de aguamiel. Mediante un modelo de regresión lineal se comparó el uso de placas 3M-PETRIFILM® contra el método convencional. Ello, para validar su equivalencia y elegir el mejor método en el recuento de microorganismos en aguamiel. Se evaluó el efecto de 0 (testigo), 3, 6, 9 y 12 min de aplicación de ozono en muestras de aguamiel y almacenado durante 12 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se evaluó el efecto de los mejores tratamientos de ozono y se les aplicó una reozonización a las 48 h de tiempo de almacenamiento, hasta acumular 72 h en almacenamiento. Se usó un modelo mixto con diseño en bloques completos aleatorios y el método de Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Se aplicó el método convencional, dado que las placas 3M-PETRIFILM® sobreestimaron el conteo de microorganismos en aguamiel. El efecto de 12 min permitió mayor reducción de la población total de microorganismos (PTM) durante 12 h (7.26 a 6.85 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$). En la vida de anaquel, el ozono conservó una baja PTM (6.35 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$) y actividad antioxidante (AA) con respecto al testigo. A mayor tiempo de almacenamiento, el pH, los SST, la concentración de compuestos fenólicos solubles totales (CF) y AA, disminuyeron. La reozonización redujo la AA del aguamiel. La aplicación del ozono logró mantener una baja PTM con respecto al testigo durante 48 h, sin embargo, no conservó las propiedades fisicoquímicas y nutracéuticas del aguamiel.

Palabras clave: microorganismos, savia, anaquel, ozonización, preservación.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Alejandra Cristina Corona Pérez

Director de Tesis: Dr. J. Joel Enrique Corrales García

GENERAL ABSTRACT

Ozonation for microbiological stability, physicochemical and nutraceutical quality of *Agave salmiana* mead

The sap of *A. salmiana* (mead) has nutritional attributes, nutraceutical and high carbohydrate content, which allow the development of a consortium of microorganisms and make this beverage highly perishable. The use of emerging technologies has shown the reduction of microorganisms and preservation of bioactive compounds. The objective of this study was to evaluate the effect of ozone application on the microbiological, physicochemical and nutraceutical stability of mead. A linear regression model was used to compare the use of 3M-PETRIFILM® plates versus the conventional method; mainly to validate the methods equivalence and to choose the best one for microorganism counting in mead. Then, the effect of 0 (control), 3, 6, 9 and 12 min of ozone application on mead samples was evaluated after 12 h of storage at room temperature. Subsequently, the effect of the best ozone treatments was chosen and a reozonation was applied after 48 h of storage, then the mead was storage to complete 72 h. A mixed model with a randomized complete block design and the Tukey-Kramer method ($\alpha=0.05$) were used. The conventional method was selected because the 3M-PETRIFILM® plates overestimated the count of microorganisms in the mead. The 12 min treatment had the maximum reduction of the total population of microorganisms (MTP) during 12 h (7.26 to 6.85 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$). The mead with the ozone treatment retained a low MTP (6.35 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$) and antioxidant activity (AA) compared to the control during the shelf life. An increment of the storage time of the mead decreased the pH, TSS, the concentration of total soluble phenolic compounds (CF) and AA. The application of ozone keeps a low MTP with respect to the control for 48 h; however, the physicochemical and nutraceutical properties of the mead were lost.

Keywords: microorganisms, sap, shelf life, ozonation, preservation.

Master's thesis in Agrifood Science and Technology, Agroindustrial Engineering Department, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Alejandra Cristina Corona Pérez
Advisor: Dr. J. Joel Enrique Corrales García

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Agave* es endémico de América, con 211 especies conocidas que predominan en provincias áridas y semiáridas (García-Mendoza, 2018). Al menos 75 % de las especies se distribuyen en México, por lo que es considerado posible centro de origen (García-Mendoza, 2007; Narváez, Saldaña, Martínez, & Jiménez, 2016). Los agaves son fuente de diversos productos, tales como: alimentos, medicamentos, fibras, bebidas alcohólicas (tequila, mezcal, aguardiente, sotol y pulque), forraje y biomasa para la producción de biocombustibles (García-Herrera et al., 2010).

Uno de los agaves de larga tradición es el maguey pulquero, recurso importante en las regiones áridas y semiáridas de la altiplanicie central de México, y su principal producto es el aguamiel, substrato fermentable para la elaboración de pulque (Reyes, Peña, Aguirre & Mora, 2019). Existen diversas especies pulqueras: *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* (Santos, Leal, Cortes & Gutierrez, 2012); sin embargo, no todas las especies de agave son adecuadas para la extracción de aguamiel. La edad de aprovechamiento para la obtención de aguamiel del agave fluctúa entre los 8 y 10 años (Chagua-Rodríguez et al., 2020).

El aguamiel se define como la savia comestible, extraída del cajete o cavidad central de plantas de agave maduras, su consumo es en fresco, fermentado o concentrado (Leal et al., 2015); es un líquido rico en carbohidratos, de color que varía de blanco tenue a amarillo claro, olor a azúcares y dulces, sin presencia de espuma, y un pH estable cercano al neutro (Chagua-Rodríguez et al., 2020; Bautista & Arias, 2008; Bautista, 2006), lo que constituye una matriz acuosa que hace al aguamiel favorable como sustrato para el desarrollo y obtención de microorganismos y muy sensible a procesos fermentativos espontáneos en el

propio cajete del agave (Chagua-Rodríguez et al., 2020). Por otra parte, el aguamiel contiene compuestos bioactivos como saponinas, vitaminas, aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos, que lo hacen un posible alimento funcional (Contreras & Guzmán, 2018). Así, la producción de aguamiel puede aprovecharse para elaborar diversos productos. La producción de *Agave salmiana* es un motor económico en regiones rurales áridas y semiáridas, cuyos productores muestran una alta incidencia de pobreza.

A. salmiana es una especie importante en Valle del Mezquital, Hidalgo, región semiárida del centro de México donde se localiza el municipio de Cardonal, principal productor de agave pulquero, el cual representa una de las principales fuentes de ingresos para la población de la región, con la obtención de diferentes productos de importancia económica, histórica y cultural, tal como el aguamiel, gusano de maguey, escapo floral, cutícula y las pencas (Narváez et al., 2016). Además, este cultivo tiene importante impacto ecológico dado que evita la erosión del suelo, al ser usado como cerca viviente. El principal aprovechamiento del cultivo en la región de estudio es la obtención de aguamiel de *A. salmiana* (García et al., 2016). En Cardonal, Hidalgo se localiza la comunidad rural Durango Daboxtha, constituida por campesinos del pueblo originario ñañú, quienes crearon la Sociedad S.P.R de R.I. denominada "Xamini", (S.P.R. de R.I. "Xamini") cuya agroindustria procesa el aguamiel para producir jarabe de agave.

Sin embargo, factores como el cambio de uso de suelo, los problemas fitosanitarios de *A. salmiana*, la sobreexplotación del cultivo y la falta de nuevas plantaciones han ocasionado insuficiente materia prima para la producción de jarabe. Esto, conduce a un proceso productivo por lotes, implicando tiempos prolongados de espera y complicando el control de la actividad microbiana que causa la fermentación del aguamiel, condición que la desecha para elaborar jarabe, puesto que afecta el sabor, el contenido de azúcares y el rendimiento.

Los tratamientos térmicos son los procesos más utilizados para conservar los alimentos, pero debido a las altas temperaturas que se requieren, estas pueden afectar las propiedades organolépticas y nutricionales en algunos alimentos en

comparación con las tecnologías no convencionales (Barbosa-Cánovas & Bermúdez-Aguirre, 2010; Figueroa-Sepúlveda et al., 2021). Actualmente, el desarrollo de nuevas tecnologías no térmicas para alargar la vida útil de los alimentos, tales como los campos eléctricos pulsados, altas presiones, cool plasma, los pulsos de luz y el ozono, entre otras, han demostrado ser alternativas para conservar la calidad final de los productos alimenticios (Akyildiz & Akdemir, 2016; Almeida et al. 2015).

Por lo tanto, es necesario la búsqueda de una tecnología no térmica para incrementar la vida de anaquel y conservar al máximo las características nutricionales y sensoriales del aguamiel, dada su insuficiente disponibilidad para un proceso continuo en la elaboración de jarabe. Una alternativa, aún no aplicada en el acondicionamiento del aguamiel, es la ozonización, tratamiento no térmico, como una tecnología emergente y ecológica de inocuidad, debido a su significativa actividad desinfectante y antimicrobiana (Pandiselvam, Sunoj, Manikantan, Kothakota & Hebbar, 2017).

Esta alternativa requiere de investigación experimental para buscar las condiciones de ozonización que permitan controlar el crecimiento microbiano del aguamiel. Con ello, se contribuiría a mejorar el proceso agroindustrial, esto mediante la conservación de la calidad del aguamiel (tal que preserve sus características fisicoquímicas y algunos compuestos con propiedades nutracéuticas), reducir los costos de producción, conocer, valorar y rescatar una bebida de alto potencial cultural. Por lo tanto, la ozonización podría ser un método alternativo y económico en la reducción de la actividad microbiana del aguamiel durante su acumulación, previo a su proceso para obtener jarabe.

Con la presente investigación se espera que la aplicación de ozono en aguamiel permita reducir la actividad microbiana y con ello, preservar su calidad e incrementar su vida útil como materia prima para elaborar jarabe. Así, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la

estabilidad microbiológica, fisicoquímica y nutraceútica de aguamiel de *A. salmiana*.

Para lograr lo anterior, en este trabajo de investigación se desarrollaron cuatro etapas, las cuales se describen a partir del Capítulo 3 de la presente tesis.

El **Capítulo 3** se enfoca en el estado del arte de la descripción botánica, distribución, cultivo y fisiología del género *Agave* específicamente sobre la especie *A. salmiana*. Posteriormente, se describe el principal producto obtenido de esta especie, denominado aguamiel, su recolección, composición química, nutricional y nutraceútica, así como su uso agroindustrial. Finalmente, se expone el uso y características de la aplicación de ozono como una tecnología alternativa utilizada para la conservación de alimentos, así como para la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y nutraceútica del aguamiel de *A. salmiana*. Con ello, promover su estudio, difusión, producción, consumo y uso agroindustrial .

El **Capítulo 4** con el fin de establecer un método apropiado para recuento de microorganismos en aguamiel, se reporta la comparación entre un método estandarizado (convencional), mediante la siembra en medios de cultivo y un método rápido mediante la siembra en placas 3M-Petrifilm® para el recuento de mesófilos aerobios, coliformes y levaduras totales en aguamiel de *A. salmiana*.

El **Capítulo 5** se evaluó el efecto de la aplicación de 0, 3, 6, 9 y 12 min de ozono en aguamiel sobre la población total de microorganismos y variables fisicoquímicas (pH y SST) del aguamiel de *A. salmiana*.

El **Capítulo 6** comprende el estudio del efecto de la aplicación de los mejores niveles de tiempo de exposición de ozono (0, 6 y 12 minutos) y una reozonación (en aguamiel con 48 h de almacenamiento) sobre la cuantificación de la población total de microorganismos (PTM), propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles totales y acidez titulable), la calidad nutracéutica (compuestos fenólicos solubles totales y actividad antioxidante) y sobre la cantidad de etanol producido.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y nutracéutica de aguamiel de *A. salmiana*

Objetivos específicos

Comparar el método convencional y método rápido (3M-Petrifilm®) para el recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y levaduras en aguamiel de *A. salmiana*.

Establecer el método apropiado del recuento de microorganismos para evaluar el efecto del tiempo de aplicación de ozono en aguamiel.

Establecer las condiciones apropiadas de aplicación de ozono en aguamiel de *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck para reducir su actividad microbiológica.

Evaluar el efecto del tiempo de ozonización (0, 3, 6, 9 y 12 min) en la reducción de la actividad microbiana del aguamiel de *A. salmiana*.

Evaluar el efecto de la aplicación de ozono de los mejores tratamientos obtenidos, previamente y la aplicación de una reozonización sobre la estabilidad fisicoquímica (pH, sólidos solubles totales y acidez titulable), nutracéutica (compuestos fenólicos) y actividad antioxidante.

Evaluar el efecto de la aplicación de ozono y reozonización sobre la producción de etanol (% v/v) en aguamiel de *A. salmiana*.

Hipótesis

La aplicación de ozono reducirá la actividad microbiológica del aguamiel, redundando en la preservación de las propiedades fisicoquímicas, calidad nutracéutica y actividad antioxidante del aguamiel de *A. salmiana*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Familia *Agavaceae*

La familia *Agavaceae* fue propuesta por Endlicher, quien tomó como tipo nomenclatura al género *Agave*, incluyendo además al género *Furcraea* (García-Mendoza & Galván 1995). Dentro de la familia *Agavaceae* existen ocho géneros reconocidos (*Yuca*, *Hesperaloe*, *Furcraea*, *Beschoria*, *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*), entre ellos el género *Agave* (García-Mendoza, 1995; Good-Avila et al., 2006), el cual es el género con mayor riqueza en México (Villaseñor, 2016).

3.1.1. Género *Agave*: clasificación y distribución

El género *Agave* fue clasificado por Gentry (1982) en dos subgéneros de acuerdo a la forma de su inflorescencia: *Littaea* que incluye a todas los agaves con inflorescencia espigada y el subgénero *Agave* con inflorescencias paniculadas o ramificadas (García-Mendoza, 2007), en 20 grupos, 211 especies, 20 subespecies, 30 variedades y 7 formas (López, Compés et al., 2017). La clasificación taxonómica del género *Agave* ha sido objeto de controversias, por lo que aún no está totalmente delimitada, debido a su gran variación fenotípica y genotípica, incluso dentro de la misma especie y de una misma población (Verduzco-Martínez et al., 2009).

El género *Agave* pertenece a la familia *Agavaceae*, es endémico de América. Se distribuye del norte de los Estados Unidos de América, hasta Colombia y Brasil. También se encuentra presente en algunos países del continente Africano, Europeo y de Oceanía (Global Biodiversity Information Facility [GBIF], 2018).

De las 211 especies que integran el género *Agave*, 159 están distribuidas en territorio mexicano, de las cuales 36 pertenecen a categorías infraespecíficas (categorías de nomenclatura taxonómica inferiores a la especie) y 119 son endémicas (García-Mendoza, 2011). Por este motivo, México es considerado el centro de origen y distribución del género *Agave* (González- Castillo & Quintos-Escalante, 2006; Colunga, 2018; García-Mendoza, 2011).

3.2. Agaves pulqueros

Las principales especies de magueyes pulqueros se encuentran dentro del subgénero *Agave* en la sección *Salmianae*, grupo con gran variabilidad morfológica y grados de domesticación (Gentry, 1982; Mora-López, Reyes-Agüero, Flores-Flores, Peña-Valdivia & Aguirre-Rivera, 2011). Dentro de las especies pulqueras se encuentran: *Agave americana* L., *A. americana* L. var. *americana*, *A. atrovirens* Karw. ex Salm-Dyck, *A. ferox* K. Koch, *A. hookeri* Jacobi, *A. mapisaga* Trel., *A. marmorata* Roezl, *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck subsp. *salmiana*, *A. scaposa* Gentry y *A. seemanniana* Jacobi (Álvarez-Duarte et al., 2018; García-Mendoza, 2011; Gentry, 1982; Mora-López et al., 2011). El *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, es endémico de México y se encuentra presente en Coahuila, Colima, Durango, Estado de México, Hidalgo, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Chávez-Güitrón et al., 2019).

3.2.1. Producción de *Agave salmiana*

Los principales estados productores de maguey pulquero son Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Estado de México (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2020). Se estima que alrededor de 27 especies crecen en el estado de Hidalgo, entre ellas *A. salmiana*, una de las especies de agave con mayor número de variedades y una de las principales especies pulqueras. (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2013). En el año 2019 se tenía en todo el país una superficie total de 8 388.50 ha de maguey pulquero; sin embargo, para el año 2020 la superficie sembrada

de maguey pulquero se redujo a una superficie total 7 421.05 ha, en donde el Estado de Hidalgo es el primer productor de maguey pulquero con una superficie sembrada de 4 858.20 ha, seguido de Puebla con 814 ha, Tlaxcala con 648 ha, y el Estado de México en cuarto lugar con una superficie sembrada de 369 ha (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2020).

3.2.2. Usos y aprovechamiento

Los agaves son fuente de diversos productos, tales como: alimentos, medicamentos, fibras, bebidas, combustible, forraje y biomasa para la producción de biocombustibles. En general, los productos obtenidos de primera instancia y de mayor valor agregado son: aguamiel del cual se deriva el pulque, las cutículas, pencas y gusanos de maguey (para uso gastronómico). Sin embargo, la obtención de aguamiel es el principal uso de casi todas las especies pulqueras (75 %) (Reyes-Aguero, Peña-Valdivia, Aguirre-Rivera & Mora-Lopez, 2019).

3.3. Aguamiel

El aguamiel, es savia extraída de diversas especies de agave (*Agave spp.*) (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018), entre las cuales se encuentran *Agave atrovirens*, *A. americana*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, y *A. salmiana* (Ortiz-Basurto et al., 2008). El aguamiel es un líquido translúcido que llega a tener un color ámbar, de un pH cercano a la neutralidad y con un ligero olor herbal cuando se encuentra recién secretado (Guzmán-pedraza & Contreras-Esquivel, 2018); contiene azúcares como glucosa, sacarosa y fructosa, fructanos, gomas, proteínas, minerales, vitaminas, aminoácidos, saponinas y compuestos fenólicos (Enríquez-Salazar et al., 2017; Muñiz-Márquez et al., 2015; Ortiz-Basurto et al., 2008; Romero-Lopez et al., 2015). No obstante, estos componentes dependen del medio natural en el que se desarrollan los agaves, temporada y la especie (García et al., 2016).

3.3.1. Proceso de obtención

La obtención del aguamiel comienza con la preparación del maguey, el cual debe ser un maguey de 8 a 10 años de edad (Chagua-Rodríguez et al., 2020). En la zona de cañadas y planicies de la región del Valle del Mezquital el *A. salmiana* cv. xamini inicia su preparación entre los 7 u 8 años, mientras que en la zona de cerro o lomerío entre los 10 y 12 años (Hernández et al., 2014).

Se cortan todas las pencas tiernas del centro de la planta, para evitar que el escape floral utilice los azúcares de la planta (Chagua-Rodríguez et al., 2020). Se realiza el capado (picazón) en la base de la piña y se dejan orar (añejar el aguamiel) durante un periodo de aproximadamente 90 días, durante este tiempo la savia se acumula por exudación (Chagua-Rodríguez et al., 2020; Hernández et al., 2016). Seguido, la recolecta de aguamiel se realiza cada 12 h, después de raspar la cavidad hecha al agave, y el periodo de producción oscila de 4 a 6 meses (Sela et al., 2008).

3.3.2. Componentes químicos del aguamiel

El aguamiel contiene agua, sacarosa, glucosa, fructosa, goma, proteínas, minerales y vitaminas (Estrada-Godina et al., 2001; Ortiz-Basurto et al., 2008); también contiene 11 % de inulina prebiótica en peso fresco (Cruz-Guerrero, Olvera, García-Garibay & Gómez-Ruíz, 2006; Martínez, 1999). Romero-López et al., (2015) caracterizaron los compuestos siguientes en el aguamiel (*A. atrovirens*): 89.61 % de humedad, 3.50 % de proteína, 3.10 % de cenizas, 61.31 % azúcares reductores totales (32.63 % fructosa y 28.68 % glucosa), mientras que el contenido de fructo-oligosacáridos fue 15.51 %. El aguamiel es una bebida de gran interés debido a su contenido de compuestos bioactivos como saponinas, antioxidantes, vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos, que lo hacen una posible bebida funcional (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018).

3.3.3. Importancia nutricional

Las propiedades nutricionales de aguamiel han sido ampliamente documentadas (Silos-Espino et al., 2007). Si se le adiciona un microorganismo probiótico puede

aumentar aún más el valor nutricional del aguamiel (Ramirez & Yañez, 2014). Martinez (1999) y Silos-Espino et al. (2007) mencionan que el aguamiel contiene aproximadamente 11 % de inulina (materia seca), mientras que el contenido de hierro y zinc es de 2.15 y 1.41 mg 100 g⁻¹, respectivamente; niveles considerablemente más altos que los encontrados en la leche. Mientras que Tovar-Robles et al. (2011) reportaron el contenido de Fe, Zn, Mg, Ca y P en concentraciones de 0.15, 1.03, 0.97, 24.53 y 12.77 mg 60 mL⁻¹, respectivamente en aguamiel de *A. salmiana*. Por su parte, Silos-Espino et al. (2007) recomendaron una ingesta de aguamiel de medio litro, a fin de que una persona pudiera obtener aproximadamente el 60 % de las necesidades diarias de Fe y Zn.

3.3.4. Importancia nutracéutica

Las tendencias mundiales de la alimentación indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos (Alvídrez-Morales, González-Martínez & Jiménez-Salas, 2002). Los nutracéuticos han revolucionado en el mercado por ser ingredientes o compuestos bioactivos de origen natural que se usan como complementos en la alimentación. Estos productos tienen como propósito mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades e incrementar la calidad de vida (Meléndez-Sosa et al., 2020).

Los nutracéuticos son sustancias consideradas como alimento o como parte de éste y que proporciona beneficios a la salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad (Leonard, 2006; Valencia, 2009;). La clasificación de los nutracéuticos, por mecanismo de acción, se divide según las funciones metabólicas y fisiológicas sobre las que actúan (Jiménez et al., 2015). Entre ellos se pueden reconocer los agentes antioxidantes, reguladores del metabolismo lipídico, antiinflamatorios e inmunorreguladores, osteogénicos y que tienen actividad anticancerígena (Balcerczyk et al., 2014; González-Sarrías et al., 2013; Paparo et al., 2014; Prabu et al., 2012; Martinez & Herradora, 2019). Con base a la naturaleza química los nutracéuticos pueden ser clasificados como: fuentes

proteicas, carbohidratos, lípidos, además de micronutrientes como metales y los compuestos por bacterias (Rojas et al., 2015).

El aguamiel puede ser considerado como un producto natural con propiedades nutraceuticas, dada su composición (compuestos prebióticos como los fructooligosacáridos, compuestos bioactivos como saponinas, vitaminas y aminoácidos) (Guzmán-pedraza & Contreras-esquivel, 2018). Tovar-Robles et al. (2011) informaron que en aguamiel la actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos era casi el doble que el jugo de naranja mezclado con extracto de nopal. Por otra parte, se ha reportado que la capacidad antioxidante del aguamiel destaca sobre la papaya, el nopal, el aguacate, el mango y la chumbera (Corral-Aguayo et al., 2008). Aunado a lo anterior, el contenido de ácido ascórbico en aguamiel es de aproximadamente 0.8 g en base seca (Tovar-Robles et al. 2011).

3.3.5. Capacidad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de interactuar con los radicales libres y parar a las reacciones en cadena, los radicales libres son causantes de estrés oxidativo y este a su vez está relacionado con fenómenos de padecimientos sobre la salud humana, de esta manera el beneficio del consumo con alto contenido de antioxidantes genera control en el crecimiento y multiplicidad de radicales libres, reduciendo así el riesgo a sufrir de enfermedades degenerativas (Chagua-Rodríguez et al., 2020).

Actualmente, existe un aumento de enfermedades degenerativas que demandan el consumo frecuente de alimentos con gran potencial antioxidante que ayuden a inhibir el efecto de los radicales libres (Chagua-Rodríguez et al., 2020). Por tal motivo, la capacidad antioxidante de los alimentos ha recibido mucha atención por parte de los consumidores (Yoshimura et al., 2016).

La eficiencia de los antioxidantes depende de las características químicas del alimento que provee este tipo de compuestos (Oroian & Escriche, 2015; Pérez-

Cabeza et al., 2018). Los antioxidantes abarcan diferentes clases de compuestos que pueden interferir en los ciclos oxidativos para inhibir o retardar el daño oxidativo de las biomoléculas. Las principales clases de compuestos con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (flavonoides, flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos) (Oroian & Escriche, 2015), que son fuertes antioxidantes y contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total de los alimentos (Zavala et al., 2007).

Los agaves son fuente de flavonoides con importancia como antioxidantes (Almaraz-Abarca et al., 2013). Así, Bautista & Arias (2008) mencionan que el aguamiel es una fuente rica de antioxidantes, por su contenido de vitamina C (14.82 mg 100 g⁻¹ aguamiel). Tovar-Robles et al. (2011) indicaron que el aguamiel proveniente de *A. salmiana* mostró una actividad antioxidante adecuada, en comparación con otras bebidas (jugo de naranja mezclado con extracto de nopal). Por otro lado, el aguamiel al ser fermentada (pulque) disminuye aproximadamente la mitad de su capacidad antioxidante (Romero-López et al., 2015).

3.3.6. Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios distribuidos ampliamente en el reino vegetal, cuya función es proporcionar un buen desarrollo y crecimiento y, a su vez, ser un mecanismo de defensa (Aguilar-Raymundo & Vélez-Ruiz, 2013; De la Rosa-Alcaraz et al., 2017). Además, estos compuestos son responsables del color y las características sensoriales de las plantas y alimentos (Peñarrieta et al., 2014). Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático; el fenol es la molécula básica de los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grupos: flavonoides que contienen un esqueleto básico C₆-C₃-C₆ y los no flavonoides. Los flavonoides incluyen varias subcategorías como los flavones, flavonoles, flavanones, y antocianinas

(Vicaş et al., 2017). En los alimentos de origen vegetal, la capacidad antioxidante se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos principalmente (Ciappini et al., 2013). La especie de Agave es rica en flavonoides, y fenólicos ácidos con importancia como antioxidantes, antibacterianos y compuestos antimicóticos, sustancias inmunomoduladoras, y componentes antinematodos, que podrían considerarse como producto nutracéutico para su aplicación en alimentos, bebidas, y como sustancias con potencial para desarrollar compuestos medicinales para humanos y animales (Almaraz-Abarca et al., 2013).

3.3.7. Microbiota del aguamiel

La microbiota de aguamiel incluye varias especies de bacterias y levaduras con importancia en la industria alimentaria. Esta microbiota determina la calidad y la vida útil de la bebida (Enríquez-Salazar et al., 2017). Durante la recolección y acumulación del aguamiel se favorece el crecimiento de microorganismos, que conducen a una fermentación alcohólica (obtención de pulque), lo que genera características indeseables para la elaboración del jarabe de agave.

Al respecto, Guzmán-Pedraza y Contreras-esquivel (2018) indicaron que el aguamiel es una fuente rica de carbohidratos y con pH aproximadamente neutro, características que lo constituyen como sustrato para el desarrollo y obtención de microorganismos. Por otra parte, Escalante et al., (2004) reportaron que la fermentación del aguamiel ocurre en el maguey, debido a la acción de algunos microorganismos, tal como; levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de polisacáridos. Los microorganismos presentes en aguamiel se clasifican en dos grupos principales, bacterias y levaduras, aunque también pueden estar presentes hongos de los géneros *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium* (Lappe-Oliveras et al., 2008).

Enríquez-Salazar et al. (2017) identificaron en aguamiel de *A. salmiana* y *A. atrovirens*, recolectado durante el invierno y el verano, 49 cepas microbianas (38 bacterias y 11 levaduras) entre las cuales se encontraron diferentes bacterias del

ácido láctico y géneros de levadura con posibles aplicaciones industriales, como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Clavispora*.

3.3.8. Producción de etanol en aguamiel

El aguamiel constituye un medio favorable para la proliferación de numerosos microorganismos asociados al medio ambiente, tales como las paredes del cajete, las herramientas de raspado o extracción, el polvo, o los insectos (Hui et al., 2012). El proceso de fermentación del aguamiel inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias etanólicas y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes & Pedroza, 2007). La gran diversidad de microorganismos se encargan de degradar los azúcares del aguamiel y convertirlos en productos como el etanol y otros compuestos volátiles (Dragone et al., 2009).

Existen dos tipos de compuestos volátiles, aquellos que se encuentran en mayor concentración o compuestos volátiles mayores (alcoholes superiores), y los compuestos volátiles que se encuentran en pequeñas concentraciones, compuestos volátiles menores (ésteres, aldehídos, cetonas, etc.). Los compuestos volátiles pueden variar en función de la especie de agave y también de los microorganismos existentes (Gómez et al., 2016). Durante la fermentación se forman compuestos por acción enzimática (metanol), asimismo por acción de las levaduras (etanol y anhídrido carbónico como productos principales, y glicerina, acetaldehído, ácidos volátiles, butilenglicol, alcoholes superiores y ácidos orgánicos como secundarios) (Gallegos-Jara & Gallegos-Hidalgo, 2019). Los alcoholes superiores son el producto del metabolismo secundario de las levaduras, son formados durante la fermentación y se generan en altas concentraciones (Loviso & Libkind, 2019). Entre los alcoholes superiores se conocen: propanol, metil-propanol, butano, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol, hexanol y fenil etanol (Gallegos & Gallegos, 2019). Mientras que, los aldehídos son compuestos muy volátiles, y su formación puede ocurrir por oxidación de los alcoholes o por descarboxilación de los alfa-cetoácidos (Borroto-Mato et al., 2017; Gallegos & Gallegos, 2019).

3.4. Tecnologías para la preservación de alimentos

El procesamiento o transformación de los alimentos permite ampliar su vida útil y su disponibilidad (Gamboa-Santos et al. 2016). Las técnicas tradicionales para la conservación de alimentos se fundamentan en la aplicación de altas temperaturas, tal como: la pasteurización, la esterilización, el escaldado y cocción, estas técnicas han sido evaluadas y aplicadas para contrarrestar los problemas relacionados con la inocuidad alimentaria. La mayoría de ellas se fundan en la destrucción o prevención del desarrollo de microorganismos (Pandiselvam et al., 2019). Sin embargo, el uso excesivo de estos tratamientos térmicos ocasionan pérdida de nutrientes y vitaminas, además degradan las características organolépticas y sensoriales de los alimentos (Camacho, 1994).

Aunado a esto, el interés por consumir alimentos mínimamente procesados, seguros, que conserven en totalidad sus características y junto con esto cumplan las exigencias medio ambientales, es motivo del surgimiento de nuevas tecnologías para la conservación y transformación de alimentos; tal es el caso de tecnologías "emergentes" y de procesamiento no térmico de alimentos que han dado importancia y aceptación entre los consumidores (Torres-Ferrer et al., 2016). Las tecnologías emergentes pueden ser utilizadas como métodos alternativos o algunas veces complementarias a los métodos tradicionales de conservación (Cruz, 2017).

Una alternativa, aun no aplicada en el acondicionamiento del aguamiel, previo para la obtención de jarabe, es la ozonización, como una tecnología emergente y ecológica de inocuidad, debido a su significativa actividad desinfectante y antimicrobiana (Pandiselvam et al., 2017). Los usos actuales del ozono en la industria alimentaria incluyen el incremento de la vida útil del producto, la esterilización de equipos, y la eliminación de aditivos y microbios indeseables durante el almacenamiento y el transporte (Pandiselvam et al., 2019).

3.4.1. Ozono

La molécula de ozono está formada por tres átomos de oxígeno; es una forma alotrópica y la disposición de sus electrones no apareados con un núcleo de oxígeno en su centro le proporciona una fuerte reactividad (Mohammadi et al., 2017).

El ozono es un poderoso oxidante, capaz de degradar las enzimas e inactivar microorganismos, sin la generación de residuos tóxicos (Choi et al., 2012; Khadre & Yousef, 2001). Su multifuncionalidad lo convierte en un prometedor agente de procesamiento de alimentos, cuyo exceso se descompone automáticamente para producir oxígeno y, por lo tanto, no deja residuos de su descomposición en los alimentos (Prabha, Deb Barma, Singh & Madan, 2015). Por ello, ha sido utilizado ampliamente por su poder oxidante como desinfectante en la producción de agua potable (Van Leeuwen et al., 2009). Su poder desinfectante hace que el ozono pueda aplicarse en sectores de la salud, en la ganadería, avicultura y en el proceso de empaquetado de frutas y verduras (Barboza et al., 2016).

3.4.2. Características del ozono

El Ozono (O_3) es un gas compuesto por moléculas triatómicas de oxígeno unidas cíclicamente (Quispe, 2017). En la estructura de la molécula los átomos de oxígeno (O_2) se organizan en un ángulo de aproximadamente $116^\circ 49'$ y la longitud del enlace es de 1.178 \AA (Audran et al., 2018). Tiene bajo peso molecular (48 Da) además de un gran poder oxidante después del flúor, cloro, trifluoruro, oxígeno atómico y el radical libre hidroxilo (Aguayo, Giménez, Escalona & Artés, 2005; Bocci, 2006; Gonçalves & Paiva, 2004).

El ozono es un gas incoloro, mientras que a una temperatura de -112°C se convierte en un líquido azulado, capaz de solidificar a -193°C en una sustancia de color azul-violáceo oscuro, casi negro (Chicón, 2014). Tiene un característico olor acre, es inestable, por lo que no puede almacenarse y debe usarse de inmediato, dado que tiene una vida media de 40 min a 20°C (Bocci, 2006; Chicón, 2014).

3.4.3. Formación del ozono

En la naturaleza, el ozono se genera a partir de la irradiación ultravioleta o descargas eléctricas (relámpagos o auroras boreales), que al incidir sobre las moléculas de oxígeno rompen el enlace O—O del O₂ (oxígeno). Los átomos de oxígeno liberados se combinan rápidamente con el O₂ para formar O₃ (Vinicio & Vega, 2008).

Por otra parte, además del método fotoquímico (radiación UV) y las descargas eléctricas (arcos eléctricos de alta tensión), existen otros métodos para la generación de ozono, entre ellos químicos, térmicos y electrolíticos (Kim et al., 1999; Patil & Bourke, 2012). Sin embargo, los métodos de generación de ozono por descarga eléctrica son muy utilizados porque proporcionan niveles de concentración muy altos (García-Chamizo et al., 2020). Estos métodos se dividen en dos tipos: descarga por el método Corona y descarga de Barrera Dieléctrica (DBD) (Silva, 2010). En ambos métodos, el ozono se forma a través de una descarga eléctrica de alta tensión que divide las molécula de oxígeno (O₂) que se encuentra en el medio ambiente y que se une rápidamente a otra molécula de oxígeno (O₂), produciendo así ozono (O₃) (García-chamizo et al., 2020; Shrestha et al., 2015).

3.4.4. Descomposición del ozono

La descomposición del ozono está dada por su reacción con compuestos orgánicos (Oner & Demirci, 2016). La ozonización de los compuestos orgánicos presentes en los alimentos es un mecanismo complejo que implica la transferencia de masa y una variedad de posibles reacciones químicas (Cullen et al., 2009).

3.5. El ozono en la industria alimentaria

Actualmente, los consumidores se centran en productos de alto valor nutritivo y mínimo contenido de aditivos sintéticos. Con base en estas premisas, la industria

alimentaria está centrando sus esfuerzos en el desarrollo de productos con alta calidad y aspecto fresco (Aguilar et al., 2018).

La Food and Drug Administration (FDA) en 1997 aprobó al ozono como GRAS (Generally Recognized As Safe) y reconoció sus propiedades antimicrobianas en el tratamiento de alimentos (Rice & Graham, 2001).

Las técnicas ecológicas como la ozonización (O_3) han llamado la atención debido a su actividad desinfectante y antimicrobiana significativa (Pandiselvam et al., 2017). Los usos actuales del ozono en la industria alimentaria incluyen extender la vida útil de verduras, frutas y jugos; la esterilización de equipos y eliminar los aditivos y microbios indeseables durante el almacenamiento y el transporte (Pandiselvam et al., 2019). Aunado a esto, el tratamiento con ozono asegura la retención de las características sensoriales, nutricionales y fisicoquímicas de los alimentos. Las condiciones de tratamiento deben determinarse específicamente para todo tipo de productos para el uso efectivo y seguro del ozono (Prabha et al., 2015).

3.6. Inactivación de microorganismos por ozono

El ozono (O_3) es un desinfectante eficaz para destruir bacterias y virus (Ebihara et al., 2013). Ha sido reportado que destruye las bacterias por una oxidación progresiva de los componentes celulares (Venta, Santa, Broche & Pérez, 2010). De tal modo que oxida fuerte y directamente las membranas citoplasmáticas y las paredes celulares de las bacterias; las vías de ataque del ozono pueden ser dos: por el camino de las glicoproteínas o a través de los aminoácidos (Pandiselvam et al., 2019). En este sentido, Arana et al. (1999) informaron que la inactivación de *Escherichia coli* por el ozono fue debida a un cambio en la permeabilidad de la membrana celular. Por otro lado, la célula posee varios sitios donde el ozono puede reaccionar, lo que conduce a la muerte celular; aunado a esto, cada microorganismo posee una inherente sensibilidad al ozono.

La Figura 1 muestra de manera general el proceso de formación de ozono y la inactivación microbiana por ozono. Inicialmente, el ozono es formado a través del rompimiento de las moléculas de oxígeno, donde los átomos de oxígeno libres se unen con moléculas de oxígeno formando así moléculas triatómicas (ozono). Posteriormente, las moléculas de ozono logran introducirse a la célula a través de la pared celular de los microorganismos, la inactivación microbiana por ozono está asociada principalmente con el daño a la superficie celular, lo que provoca la lisis celular (Cho et al., 2010). Asokapandian et al. (2018) informaron que los hongos y levaduras son más resistentes al ozono que las bacterias; las bacterias Gram-positivas son más sensibles que los microorganismos Gram-negativos y las células vegetativas son más sensibles que las esporas.

El ozono se encuentra de manera natural en los vegetales y reacciona con la fitohormona etileno formando un producto intermedio, óxido de etileno y posteriormente se convierte en dióxido de carbono y agua. Sin embargo, el óxido de etileno formado es un inhibidor efectivo de mohos, levaduras, y bacterias, principalmente en frutos secos, especias y alimentos para animales (Pérez-Calvo, 2019).

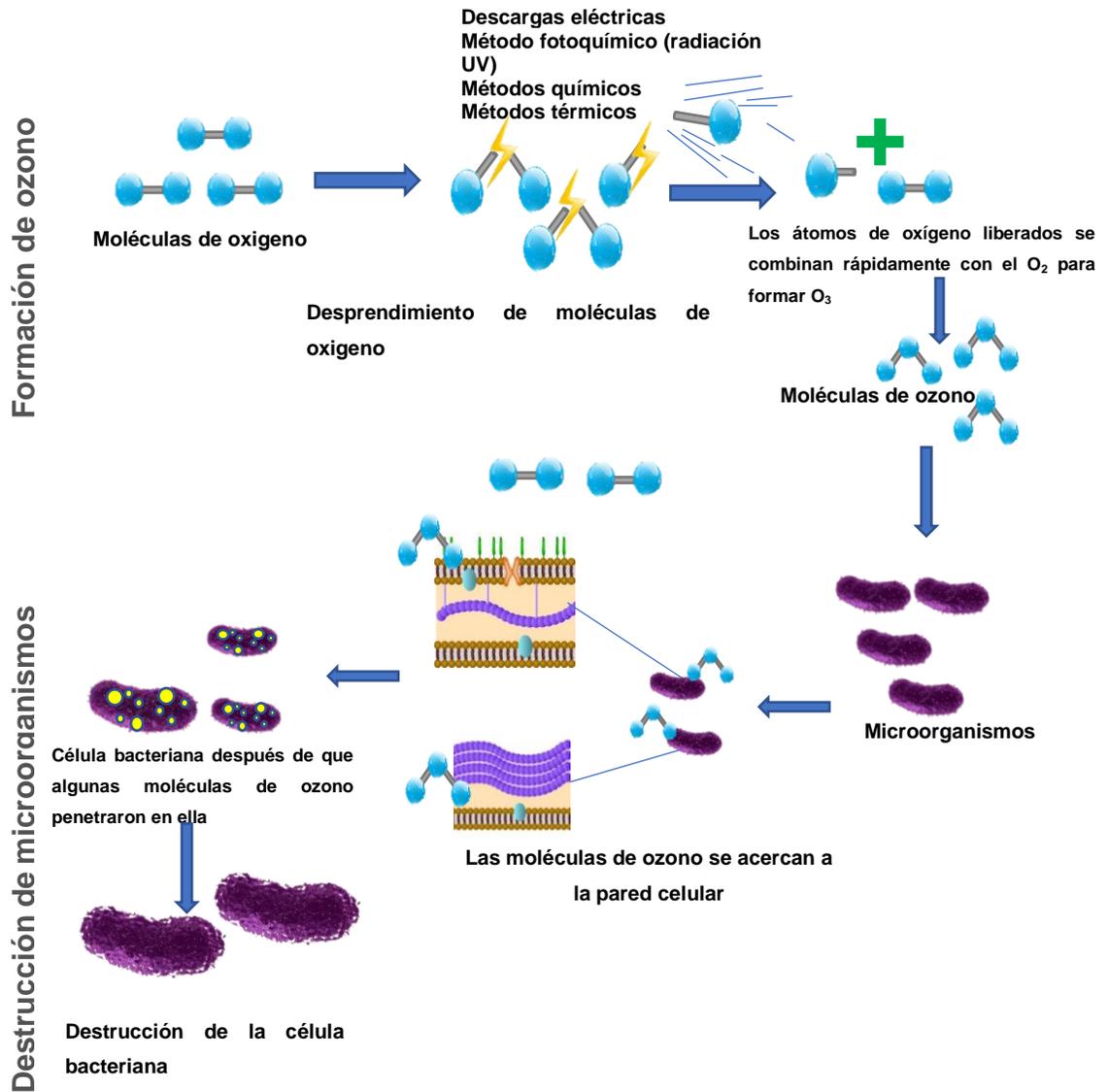


Figura 1. Formación de ozono y destrucción de microorganismos mediante ozono. Fuente: Elaboración propia con datos de Asokapandian et al. (2018) y Parzanese (2013).

El Cuadro 1 muestra diversos estudios donde se aplicó ozono en alimentos líquidos para la destrucción de microorganismos.

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de ozono sobre los microorganismos en diferentes productos líquidos.

Producto	Condiciones y función	Referencia
Jugo de pitaya	Aplicación de ozono con una concentración y a un flujo de 24 mg O ₃ ⁻ 1 L min ⁻¹ durante 9.6 minutos. Reducción de 0.47-log ₁₀ y 2.51-log ₁₀ UFC mL ⁻¹ de <i>S. cerevisiae</i> y <i>L. innocua</i> , respectivamente.	(García-Mateos et al., 2019)
Jugo de melón	Aplicación de ozono a una concentración de 7.0 ± 2.4 g L ⁻¹ durante 60 minutos. Reducción de 2.22 ± 0.04 ciclos logarítmicos de esporas de <i>A. acidoterrestris</i> .	(Fundo et al., 2018)
Leche	Aplicación de ozono gaseoso con un flujo de 80 mg min ⁻¹ durante 5 minutos. Reducción del 50 % de Aflatoxin M1.	(Mohammadi et al., 2017)
Jugo de tuna blanca	Aplicación de una concentración de ozono (180 mg de O ₃ *hr-1) durante 8 min. Eliminación total de <i>S. aureus</i> y hongos.	(Vidal, 2015)
Jugo de durazno	Aplicación de ozono acuoso a una concentración de 10 o 18 ppm durante 12 minutos. Reducción de 4.3 ciclos log de coliformes totales, 3.9 y 4.9 ciclos logarítmicos de <i>L. innocua</i> ATCC y 1 ciclo logarítmico de <i>S. cerevisiae</i> .	(García Loredo et al., 2015)
Jugo de manzana	Aplicación de ozono con un flujo de 2.8 y 5.3 mg L ⁻¹ durante 40 minutos a 4 ° C. Reducción de 2.2 y 2.8 log de esporas de <i>A. acidoterrestris</i> , respectivamente.	(Torlak, 2014)
Jugo de manzana	Aplicación de ozono gaseoso con un flujo de 3.0 L min ⁻¹ con una concentración de 2.0-3.0 g m ³ durante un 1 min a una temperatura de 25 y 45 ° C. Reducción de 1.50 y 1.60 log UFC mL ⁻¹ , respectivamente de <i>E. coli</i>	(Choi et al., 2012)

3.7. El pH y el efecto del ozono

El valor del pH hace referencia a la medida de equilibrio de la concentración de iones de hidrógeno (H^+) en una solución y refleja el grado de acidez y alcalinidad (Lugo-Varillas et al., 2020).

El mecanismo de acción del ozono se caracteriza por su poder oxidativo sobre los microorganismos, no obstante, el pH de la solución es uno de los factores que influyen durante la oxidación. En la Figura 2, se puede observar dos tipos de reacción oxidativa dependiendo de las condiciones de pH presentes en las soluciones acuosas (Rodríguez et al., 2008): (a) para condiciones ácidas la oxidación directa se presenta con ozono molecular, mientras que (b) en condiciones básicas predomina la oxidación debida al radical hidroxilo $OH\cdot$ (mecanismo fundamental cuando el propósito de la utilización del ozono es la oxidación o la conversión de compuestos recalcitrantes) (Lorenzi-Newman, 2018).

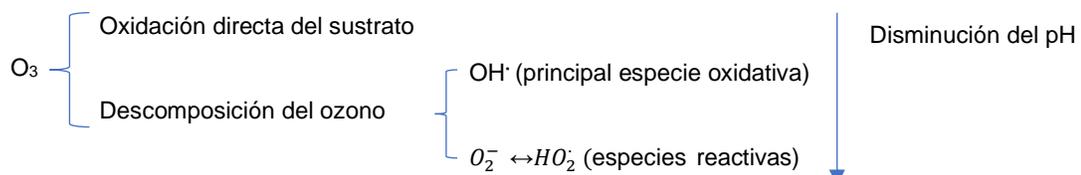


Figura 2. Mecanismo de acción del ozono según el pH
Fuente: (Hoigne & Bader, 1970; Rodríguez et al., 2008)

Por su parte, Hoigne & Bader (1970) mencionan que independientemente de un valor de pH crítico, existen dos vías de reacción del ozono, la primera mediante la formación de radicales hidroxilo que se convierten en oxidantes importantes. La segunda vía de reacción depende de la velocidad con la cual el O_3 reacciona directamente con los sustratos y sobre los solutos, incluidos los productos de reacción.

Es decir, a pH bajo el ozono produce mayor grado de mineralización, dando como resultado productos que ayudan a la reducción de la actividad microbiana comparado con productos formados a pH más alto (Alvares, Diaper & Parsons,

2001). El efecto del pH sobre la inactivación del ozono se atribuye principalmente al hecho de que la tasa de descomposición del ozono cambia sustancialmente con los cambios en el pH. A pH alto, las reacciones en cadena de la descomposición del ozono dan como resultado la formación de numerosas especies de radicales con altas capacidades oxidativas (Patil et al., 2010).

3.8. Efecto del ozono sobre compuestos bioactivos

La preservación de los compuestos bioactivos, la estabilidad durante el almacenamiento y la seguridad son de suma importancia en la industria de alimentos frescos mínimamente procesados (Allothman et al., 2010). El uso del nivel adecuado de ozono ha demostrado un efecto positivo en algunos compuestos bioactivos, ayuda a mantener los atributos de frescura en los alimentos, preservan el estado de los antioxidantes, da estabilidad de almacenamiento y, sobre todo, la inocuidad de los alimentos.

El ozono (O_3) es un fuerte oxidante, su poder oxidativo es 1.5 más veces que el cloro (Andrade et al., 2018). Una sola molécula de oxígeno que libera el ozono se adhiere a cualquier otro compuesto en el agua, oxidando esos compuestos en otros compuestos diferentes, es decir, una molécula de oxígeno reaccionará con todos los compuestos orgánicos y muchos inorgánicos, y los oxidará. (Shezi et al., 2020). Esto se denomina estrés oxidativo, en los sistemas biológicos, y resulta de la presencia de niveles elevados de agentes oxidantes que pueden abstraer electrones de moléculas orgánicas esenciales y perturbar las funciones celulares (Baier et al., 2005). Por lo tanto, el ozono, al entrar en contacto con los alimentos, es un activador para la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales hidroxilos, los aniones superóxido, el peróxido de hidrógeno, etc. en las células (Karaca & Velioglu, 2014; Rozpádek et al., 2014). Sin embargo, las ROS oxidan los componentes celulares como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos y puede iniciar reacciones en cadena. En consecuencia, una red de mecanismos de defensa y reparación contrarresta estas reacciones de oxidación (Baier et al., 2005). Los compuestos fenólicos y otros compuestos

antioxidantes, como el ácido ascórbico (Rysman et al., 2016), reaccionan con las ROS presentes en la matriz del alimento para evitar daños (Larson, 1995; Moldau, 1998), por lo cual esta es una de las causas que disminuye la concentración de algunos compuestos bioactivos durante la aplicación de ozono. Lv et al. (2019) mencionan que los compuestos fenólicos en las frutas reaccionan con las ROS y previenen daño a otros compuestos como lípidos y proteínas, por tal motivo las concentraciones fenólicas son disminuidas. Por otra parte, un estrés oxidativo que puede generar ROS (Wang et al., 2012), que a su vez pueden activar mecanismos de defensa, puede inducir una variedad de compuestos de defensa en la planta, como el de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) (Koch et al., 1998). La PAL es la enzima clave que puede sintetizar más compuestos fenólicos y de esta manera aumentar sus concentraciones (Lv et al., 2019).

Por otra parte, la alta concentración de ozono y un largo tiempo de tratamiento, puede ocasionar efectos negativos en algunos alimentos. Tiwari et al. (2009) demostraron que la alta concentración de ozono durante un tiempo prolongado dio lugar a una importante degradación de las antocianinas y el color en zumo de mora, jugo de uva (Tiwari et al., 2009) y jugo de fresa con una aplicación de 7.8 % de ozono durante 10 min (Tiwari et al., 2009b).

Fundo et al. (2018) indicaron que algunos parámetros de calidad pueden ser afectados por tratamientos con ozono, sin embargo, las condiciones de tratamiento deben determinarse específicamente para cada producto (Prabha et al., 2015). Se debe buscar la concentración y el tiempo correctos, para aumentar el sistema antioxidante enzimático y no enzimático en los alimentos (Goffi et al., 2020). Finalmente, la concentración de ozono, el tiempo de tratamiento y los métodos de aplicación deben evaluarse detalladamente para lograr el máximo efecto de desinfección y la mínima e incluso evitar la descomposición de los compuestos bioactivos en la aplicación futura (Li et al., 2017).

3.9. Literatura citada

- Aguayo, Giménez. E. P. Escalona, C. V. H., & Artés, C. F. (2005). *Revisión: el ozono y su utilización en la industria agroalimentaria*. Disponible en <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/309/366-1-2005.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aguilar-Raymundo, V. G., & Vélez-Ruiz, J. F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, August*, 25–34.
- Aguilar, D., Morales-Oyervides, L., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A., Raso, J., & Montañez, J. (2018). Effect of ozone processing conditions on stability of fungal pigments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.002>
- Almaraz-abarca, N., Delgado-alvarado, E. A., Ávila-reyes, J. A., Urbesoto, J. N., & González-valdez, L. S. (2013). The Phenols of the Genus *Agave* (*Agavaceae*). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 9–16.
- Almeida, F. D. L., Cavalcante, R. S., Cullen, P. J., Frias, J. M., Bourke, P., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2015). Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.001>
- Allothman, M., Kaur, B., Fazilah, A., Bhat, R., & Karim, A. A. (2010). Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.08.008>
- Alvares, A. B. C., Diaper, C., & Parsons, S. A. (2001). Partial Oxidation by Ozone to Remove Recalcitrance from Wastewaters - a Review. *Environmental Technology*, 22(4), 37–41. <https://doi.org/10.1080/09593332208618273>
- Álvarez-Duarte, M. del C., García-Moya, E., Suárez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodríguez-Acosta, M. (2018). Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del Maguey pulquero en municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica*, 0(45), 205–222. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.15>
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B., & Jiménez-Salas, E. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3).
- Andrade, M. J., Guijarro, M., Jara, S., Narváez, P., Moreno, C., & Concellón, A. (2018). Efecto del tratamiento con ozono gaseoso

- sobre la calidad fisicoquímica y capacidad antioxidante de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(2).
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541004>
- Arana, I., Santorum, P., Muela, A., & Barcina, I. (1999). Chlorination and ozonation of waste-water: Comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *Journal of Applied Microbiology*, 86(5), 883. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00772.x>
- Asokapandian, S., Periasamy, S., & Swamy, G. J. (2018). Ozone for Fruit Juice Preservation. In *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00025-4>
- Audran, G., Marque, S. R. A., & Santelli, M. (2018). Ozone, chemical reactivity and biological functions. *Tetrahedron*, 74(43), 6221–6261. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.09.023>
- Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D., & Dietz, K. J. (2005). Oxidative stress and ozone: Perception, signalling and response. *Plant, Cell and Environment*, 28(8), 1012–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01326.x>
- Balcerczyk, A., Gajewska, A., Macierzyńska-Piotrowska, E., Pawelczyk, T., Bartosz, G., & Szemraj, J. (2014). Enhanced antioxidant capacity and anti-ageing biomarkers after diet micronutrient supplementation. *Molecules*, 19(9), 14794–14808. <https://doi.org/10.3390/molecules190914794>
- Barboza, K. G. R., Juárez, M. D. R. A., & Caballero, D. R. (2016). Eliminación de microorganismos mediante la aplicación de ozono. *Jóvenes en la ciencia*, 2(1), 1932–1935. <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1325>
- Barbosa-Cánovas, G., & Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 81-93.
- Bautista, N., & Arias, G. C. (2008). Estudio químico bromatológico de aguamiel de *Agave americana* L.(Maguey). *Ciencia e Investigación*, 11(2), 46–51.
- Bautista, N. C. (2006). *Estudio químico-bromatológico y elaboración de nectar de aguamiel de Agave americana L.(maguey) procedente de Ayacucho*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5(2), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Borroto-Mato, D., Lorenzo-Izquierdo, M., García-Gutiérrez, R., & Reyes-

- Linares, A. (2017). Aspectos generales sobre la determinación de alcoholes superiores en bebidas alcohólicas. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 51(3), 58–65. <https://www.redalyc.org/exportarcita.oa?id=223158039009>
- Camacho.O.C. (1994). *Conferencia sobre" Obtención y conservación de Néctares de Frutas*.
- Cervantes-contreras, M., & Pedroza-rodríguez, A. M. (2007). *El pulque : características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman* . 135–146.
- Chagua-Rodríguez, P., Malpartida-Yapias, R. J., & Ruíz-Rodríguez, A. (2020). Tiempo de pasteurización y su respuesta en las características químicas y de capacidad antioxidante de aguamiel de Agave americana L. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 45–57. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.532>
- Chávez-Güitrón, L. E., Florencia del, C. S. P., Pérez-Salinas, E. A., Caballero, J., Vallejo-Zamora, A., & Sandoval-Zapotitla, E. (2019). Variation of epidermal-foliar characters of Agave *salmiana* subsp. *Salmiana* (Asparagaceae) in the center of Mexico. *Botanical Sciences*, 97(4), 711–724. <https://doi.org/10.17129/botsci.2159>
- Chicón, L. (2014). *Ozono atmosférico*. Disponible en <https://ambientis.org/ozono.pdf>
<http://www.ambientis.org/ozono.pdf>
- Cho, M., Kim, J., Kim, J. Y., Yoon, J., & Kim, J. H. (2010). Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44(11), 3410–3418. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- Choi, M. R., Liu, Q., Lee, S. Y., Jin, J. H., Ryu, S., & Kang, D. H. (2012). Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes in apple juice with gaseous ozone. *Food Microbiology*, 32(1), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.002>
- Ciappini, M. C., Stoppani, F. S., Martinet, R., & Alvarez, M. B. (2013). Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 19, 45–51.
- Colunga, G. M. (2018). *Base de datos de nombres técnicos o de uso común en el aprovechamiento de los agaves en México*. CONABIO. <https://www.gbif.org/dataset/d9bceb64-0334-43e8-868e-72d4cd506ca1#description>
- Corral-Aguayo, Rene D.; Yahia, Elhadi M.; Carrillo-Lopez, Armando; González-Aguilar, Gustavo (2008). Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity

Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10498–10504. doi:10.1021/jf801983r

- CONABIO. (2013). *Catálogo taxonómico de especies de México*. Disponible en https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/magnoliayMarg/cactaceas.html
- Cruz, J. O. (2017). Tecnologías emergentes en la preservación de alimentos—Revisión. *Revista Caxamarca*, 16(2).
- Cruz-Guerrero, A. E., Olvera, J. L., García-Garibay, M., & Gómez-Ruiz, L. (2006). Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 115.
- Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & Donnell, C. P. O. (2009). Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3–4), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.049>
- De la Rosa-Alcaraz, M. de los Á., Torrescano Urrutia, G. R., Pérez Álvarez, J. Á., Fernández López, J., & Sánchez Escalante, A. (2017). Evaluación de fitoquímicos y actividad antioxidante de subproductos de dátil (*Phoenix dactylifera* L.) producidos en el estado de Sonora. *Biotecnia*, 19(3), 11–17. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v19i3.442>
- Dragone, G., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. (2009). Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, 112(4), 929–935. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.005>
- Ebihara, K., Mitsugi, F., Ikegami, T., Nakamura, N., Hashimoto, Y., Yamashita, Y., Baba, S., Stryczewska, H. D., Pawlat, J., Teii, S., & Sung, T. L. (2013). Ozone-mist spray sterilization for pest control in agricultural management. *EPJ Applied Physics*, 61(2), 1–5. <https://doi.org/10.1051/epjap/2012120420>
- Enríquez-Salazar, M. I., Veana, F., Aguilar, C. N., De la Garza-Rodríguez, I. M., López, M. G., Rutiaga-Quñones, O. M., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 1003–1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279.

<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>

- Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M., & Gomez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeast from Agave sap (aguamiel) and pulque. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 557–560.
- Figueroa-Sepúlveda, K., Castillo-Robles, N. Z., & Martínez-Girón, J. A. D. E. R. (2021). Aplicación de altas presiones y otras tecnologías en frutas como alternativa de tratamientos térmicos convencionales. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(2), 271-285
- Fundo, J. F., Miller, F. A., Tremarin, A., Garcia, E., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2018). Quality assessment of Cantaloupe melon juice under ozone processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.016>
- Gallegos Jara. R. O., & Gallegos Hidalgo. P. E. (2019). Evolución del contenido de etanol, metanol, aldehidos, alcoholes superiores y furfural durante la destilación del Pisco Italia, y su relación con los puntos de corte. *ÑAWPARISUN-Revista de Investigacion Cientifica*, 2(1), 13–24. Obtenido de <http://unaj.edu.pe/revista/index.php/vpin/article/viewFile/68/42>
- Gamboa-santos, J., Carvajal, G., & Pilamala, A. (2016). Aplicación de tecnologías emergentes al procesamiento de frutas con elevada calidad nutricional. Una revisión Application of emerging technologies to fruits processing with high nutritional quality . – A review. *Rev. Colomb. Investig. Agroindustriales*, 3, 57–75.
- García-Chamizo, J. M., Alcañiz-lucas, S., Ferrández-, F. J., Joaquín, J., Maciá, P., Madrid, D. S., & Pérez, M. G. (2020). Revisión de las Aplicaciones del Ozono y su Generación para el Uso en Mascarillas contra Patógenos . Versión Preliminar. *RUA. Repositorio Institucional de La Universidad de Alicante*.
- García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., & Talavera-Magaña, D. (2010). El genero Agave spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial*, 5(73), 109–129. <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/documentos/09.pdf>
- García-Mendoza, A. (1995). *Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México*. Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques,.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23. <https://doi.org/0187-6376>

- García-Mendoza, Abisaí. (2011). Agavaceae. In *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán* (Vol. 88).
- García-Mendoza, Abisaí, & Galván-V., R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences*, 24(56), 7. <https://doi.org/10.17129/botsci.1461>
- García-Mendoza, J. A. (2018). *México cuenta con 159 especies de agave; investigadores de la UNAM encontraron 4 nuevas*. Boletín UNAM-DGCS-045. http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_045.html
- García Loredo, A. B., Guerrero, S. N., & Alzamora, S. M. (2015). Inactivation kinetics and growth dynamics during cold storage of *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Saccharomyces cerevisiae* KE162 in peach juice using aqueous ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.007>
- García, V., Fernández, A., Manuel, M., Chulim, E., Gabriel, N., Torres, O., Juárez, R., & María, A. (2016). El Maguey Pulquero, Una Planta Multifuncional Y Polifacética: Los Usos Desde Una Visión Mestiza E Indígena. *Scripta Ethnologica*, XXXVIII, 65–87.
- GBIF. (2018). *Agave L. Disponible en* https://www.gbif.org/occurrence/taxonomy?country=BR&country=AR&country=CL&country=UY&country=PY&country=BO&country=PE&country=CO&country=EC&country=VE&country=GY&has_coordinate=false&taxon_key=2766430&year=2009,2018&advanced=1
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America* (University).
- Goffi, V., Magri, A., Botondi, R., & Petriccione, M. (2020). Response of antioxidant system to postharvest ozone treatment in ‘Soreli’ kiwifruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 961–968. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10055>
- González Castillo, M. P., & Quintos Escalante, M. (2006). *Insectos asociados al Agave en el estado de Durango*. Obtenido de <https://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8290>
- Gómez, O., De Jesús, K., Peñafiel, F., & Tovar, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 916–923.
- Gonçalves, A. A., & Paiva, F. G. (2004). El ozono como agente antiséptico en la industria pesquera. *Infopesaca Internacional*, 31(1), 345–367. <https://www.researchgate.net/publication/267450653>
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2013). Nutraceuticals for older people: Facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*, 75(4), 313–

334. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.05.006>

- Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 9124–9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9178>
- Guzmán-pedraza, R., & Contreras-esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1–22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Hernández Ramos, L., & Colinas León, M. T. B. (2014). *Valor nutracéutico y nutricional de aguamiel y miel de maguey obtenida por tres métodos de deshidratación* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo). No. Tesis H474.
- Hoigne, J., & Bader, H. (1970). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research*, 10(5), 377–386.
- Hui, Y., Evranuz, E., Escalante, A., Giles-Gómez, M., Flores, G., Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque Fermentation. In *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition* (Issue May, pp. 691–706). <https://doi.org/10.1201/b12055-50>
- Jiménez, S. R., Valle, J. S. L., Ocampo, A. U., Pérez, S. C., Hernández, N. P., & Cárdenas, J. S. M. (2015). Consumo de nutracéuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Biosalud*, 14(2), 91-103.
- Karaca, H., & Velioglu, Y. S. (2014). Effects of ozone treatments on microbial quality and some chemical properties of lettuce, spinach, and parsley. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.003>
- Khadre, M. A., & Yousef, A. E. (2001). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2–3), 131–138. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00561-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00561-X)
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>
- Kim, J. G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1071–1087. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1071>
- Koch, J. R., Scherzer, A. J., Eshita, S. M., & Davis, K. R. (1998). *Ozone*

Sensitivity in Hybrid Poplar Is Correlated with a Lack of Defense-Gene Activation 1. 1243–1252.

- 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 nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Larson, R. A. (1995). Antioxidant mechanisms of secondary natural products. In *Oxidative stress and Antioxidant Defenses in Biology* (pp. 210-237). Springer, Boston, MA.
- Leonard, H. P. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, XL(3), 20–28.
- Li, F., Chen, G., Zhang, B., & Fu, X. (2017). Current applications and new opportunities for the thermal and non-thermal processing technologies to generate berry product or extracts with high nutraceutical contents. *Food Research International*, 100(August), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.035>
- López, Compés, R., Azcárate, García, T., Mollá-Bauzá, Brugarolas, M., Martínez, Martínez-Carrasco, L., Poveda, Martínez, Á., Aracil, Ruiz, C., Figueroa, Barrena, R., Navarro, Langreo, A., & Ruiz, Aguilar, C. (2017). *XI Congreso de la Asociación Española de Economía Agraria*. 48.
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Lorenzi Newman, S. A. (2018). Propuesta de mejora tecnológica en sistema de tratamiento y reutilización de aguas residuales de una planta papelera para la implementación de ciclo cerrado. Obtenido de <https://repositorio.usm.cl/bitstream/handle/11673/49283/3560902038814UTFSM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lugo-Varillas, J. G., Tinedo-López, P. L., Watanabe-Oshiro, G., Correa-Medina, A., Álvarez-Vidigal, E., & Hermoza-Novoa, M. (2020). Influencia del nivel de pH de geles blanqueadores en la rugosidad superficial del esmalte bovino. *Odovtos International Journal of Dental Sciences*, 2(22), 113–123. <https://doi.org/10.15517/IJDS.2020.39733>
- Lv, Y., Tahir, I. I., & Olsson, M. E. (2019). Effect of ozone application on bioactive compounds of apple fruit during short-term cold storage. *Scientia Horticulturae*, 253(April), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.021>

- Martinez, M. (1999). *Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de Agave pulquero*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Martinez, V. K. I., & Herradora, L. M. (2019). *Fitobióticos ¿Una Alternativa Real?* BMeditores. <https://bmeditores.mx/porcicultura/fitobioticos-una-alternativa-real-2485/>
- Meléndez-Sosa, M. F., García-Barrales, A. M., & Ventura-García, N. A. (2020). Perspectivas e impacto en la salud del consumo de los alimentos funcionales y nutraceuticos en México. *RD-ICUAP*, 6(1), 114–136. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811517-6/00002-7>
- Mohammadi, H., Mazloomi, S. M., Eskandari, M. H., Aminlari, M., & Niakousari, M. (2017). The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. *Ozone: Science and Engineering*, 39(6), 447–453. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1329647>
- Moldau, H. (1998). Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 617–622.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). *Variación morfológica y humanización de la sección salmianae del género agave morphological variation and humanization of agave genus, salmianae section*. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v45n4/v45n4a6.pdf>
- Muñiz-Márquez, D. B., Contreras, J. C., Rodríguez, R., Mussatto, S. I., Wong-Paz, J. E., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2015). Influencia del efecto térmico sobre la composición de azúcares de jarabe de Agave Mexicano. *CyTA-Journal of Food*, 13(4), 607–612. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1028452>
- Narváez, S. U., Martínez, T., & Jiménez, V. M. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano The cultivation of maguey pulquero: an option for the development of rural communities in the Mexican Central Plateau. *Revista de Geografía Agrícola*, 56, 33–44.
- O'Donnell, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & Rice, R. G. (2012). *Ozone in food processing*. John Wiley & Sons.
- Oner, M. E., & Demirci, A. (2016). Ozone for Food Decontamination : Theory and Applications *. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00033-9>
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis Mircea. *Food Research International*, 74, 10–36.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>.The

- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Domier, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey pulquero (*Agave mapisaga*) through out the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 56, 3682–3687. <https://doi.org/http://dx.doi.org/0.1021/jf072767h>
- Pandiselvam, R., Subhashini, S., Banuu Priya, E. P., Kothakota, A., Ramesh, S. V., & Shahir, S. (2019). Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone: Science and Engineering*, 41(1), 17–34. <https://doi.org/10.1080/01919512.2018.1490636>
- Pandiselvam, R., Sunoj, S., Manikantan, M. R., Kothakota, A., & Hebbar, K. B. (2017). Application and Kinetics of Ozone in Food Preservation. *Ozone: Science and Engineering*, 39(2), 115–126. <https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1268947>
- Paparo, L., Di Costanzo, M., Di Scala, C., Cosenza, L., Leone, L., Nocerino, R., & Canani, R. B. (2014). The influence of early life nutrition on epigenetic regulatory mechanisms of the immune system. *Nutrients*, 6(11), 4706–4719. <https://doi.org/10.3390/nu6114706>
- Parzanese, M. (2013). *Tecnologías para la Industria Alimentaria: Ozono en alimentos (No. H2720)*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires (Argentina)..
- Patil, S., & Bourke, P. (2012). Ozone Processing of Fluid Foods. In *Novel Thermal And Non-Thermal Technologies For Fluid Foods*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381470-8.00009-8>
- Patil, S., Valdramidis, V. P., Cullen, P. J., Frias, J., & Bourke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiology*, 27(6), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.002>
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Progress in Food Chemistry*, 31(2), 68–81. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001>
- Pérez-Cabeza, S. B., Morón Angarita, N., Cervantes, M., & Barón-Rodríguez, M. A. (2018). Evaluación del potencial antioxidante en extracto de espinaca por voltamperometría cíclica. *Revista ION*, 30(2), 99–105. <https://doi.org/10.18273/revion.v30n2-2017009>
- Pérez-Calvo, M. (2019). Sanitation With Ozone. In *Gases in Agro-Food Processes* (Academic P, pp. 561–567). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812465-9.00023-2>

- Prabha, V., Deb Barma, R., Singh, R., & Madan, A. (2015). Ozone Technology in Food Processing: A Review. *Trends in Biosciences*, 8(16), 4031–4047.
- Prabu, S. L., SuriyaPrakash, T. N. K., Dinesh, K., Suresh, K., & Ragavendran, T. (2012). Nutraceuticals: A Review. *Elixir Pharmacy*, 46, 8372–8377.
- Quispe, Q. B. (2017). *Eficacia del número de aplicaciones del endozone® en la desinfección de conductos radiculares en pacientes de la clínica odontológica*. Disponible en <https://1library.co/article/ozono-conceptos-básicos-marco-teórico.zkw3lj8z>
- Ramirez, M. L. R., & Yañez, M. L. A. (2014). Probiótica de agave entre la población urbana y la población rural. *European Scientific Journal*, 10(31), 71–87.
- Reyes-Aguero, J. A., Peña-Valdivia, C. B., Aguirre-Rivera, J. R., & Mora-Lopez, J. L. (2019). Intraspecific variation of agave mapisaga trel. and a. *salmiana* otto ex salm-dyck. (asparagaceae) related to ancestral usages at the hñähñu region in central mexico variación. *AGROCIENCIA*, 53(4), 563–579.
- Rice, R. G., & Graham, D. M. (2001). U.S. FDA Regulatory Approval of Ozone as an Antimicrobial Agent – What Is Allowed and What Needs to Be Understood. *Ozone News*, 29(5), 22–31. <http://www.technozone.in/img/pdf/FDA-e.pdf>
- Rodriguez, T., Botelho, D., & Cleto, E. (2008). Tratamiento de efluentes industriales de naturaleza recalcitrante usando ozono , peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta Treatment of industrial effluents of recalcitrant nature using ozone , hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 46, 24–38.
- Rojas, S., Lopera, J. S., Uribe, A., Correa, S., Perilla, N., & Marín, J. S. (2015). Consumo de nutracéuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Biosalud*, 14(2), 91–103. <https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.9>
- Romero-López, M. R., Osorio-Díaz, P., Flores-Morales, A., Robledo, N., & Mora-Escobedo, R. (2015). Antioxidante y el efecto prebiótico del aguamiel (*Agave atrovirens*) durante su fermentación in vitro. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 281–292.
- Rozpadek, P., Nosek, M., Ślesak, I., Kunicki, E., Dziurka, M., & Miszański, Z. (2014). Ozone fumigation increases the abundance of nutrients in Brassica vegetables: broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*). *European Food Research and Technology*, 240(2), 459–462. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2372-z>

- Rysman, T., Utrera, M., Morcuende, D., Van Royen, G., Van Weyenberg, S., De Smet, S., & Estévez, M. (2016). Apple phenolics as inhibitors of the carbonylation pathway during in vitro metal-catalyzed oxidation of myofibrillar proteins. *Food Chemistry*, 211, 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.126>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2018). Cierre de la producción agrícola. Anuario Estadístico Nacional de la Producción Agrícola.
- Sela, R. O. S. A. I., Asurto, O. R., Ourcelly, G. É. P., Oco, T. H. D., Illiams, P. A. W., Ornier, M. A. D., & Elleville, M. A. I. B. (2008). *Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (Agave mapisaga) throughout the Harvest Period*. 3682–3687.
- Shezi, S., Samukelo Magwaza, L., Mditshwa, A., & Zeray Tesfay, S. (2020). Changes in biochemistry of fresh produce in response to ozone postharvest treatment. *Scientia Horticulturae*, 269(November 2019), 109397. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109397>
- Shrestha, R., Joshi, U. M., & Subedi, D. P. (2015). Experimental Study of Ozone Generation by Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge. *International Journal of Research and Review*, VIII(4), 24–29.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2020). Disponible en <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2018). Disponible en <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-pulquero?idiom=es>
- Silos-Espino, H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M. E., & Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and in vitro propagation of agave salmiana “Gentry.” *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3), 355–359. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512242>
- Silva, M. P. (2010). Hypatia - Revista de Divulgación Científico - Tecnológica del Estado de Morelos . - Hy ... Hypatia, 28, 1–2.
- Teramura, H., Ushiyama, M., & Ogihara, H. (2015). Evaluation of a novel dry sheet culture method (Sanita-kunR) for rapid enumeration of yeasts and molds in foods. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.017>
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N., & Cullen, P. J. (2009a). Anthocyanins and color degradation in ozonated grape juice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2824–2829. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.001>

- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., Brunton, N., & Cullen, P. J. (2009b). Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. *Food Chemistry*, 113(4), 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.085>
- Tiwari, Brijesh K., O'Donnell, C. P., Brunton, N. P., & Cullen, P. J. (2009). Degradation kinetics of tomato juice quality parameters by ozonation. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(6), 1199–1205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01946.x>
- Torlak, E. (2014). Efficacy of ozone against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.035>
- Torres-Ferrer, Y., Ribeaux-Kindelán, G., Rivera-Soto, M., & Cardona-Parlade, A. I. (2016). Influencia de un campo electromagnético de baja frecuencia en la flora microbiana de un néctar de mango. *Tecnología Química*, 36(3), 371–378.
- Tovar-Robles, C. L., Perales-Segovia, C., Nava, C. A., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, J. L. M., & Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10(2), e21. <https://doi.org/10.4081/ijas.2011.e21>
- Tovar-Robles, Clara L., Perales-Segovia, C., Cedillo, A. N., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, J. L. M., & Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10(2), e21. <https://doi.org/10.4081/ijas.2011.e21>
- Valencia, L. T. A. (2009). Aprovechamiento tecnológico del lactosuero y el gel deshidratado de *Opuntia subulata* para la elaboración de una bebida nutracéutica. escuela superior politécnica de chimborazo (Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo)
- Van Leeuwen, J., Sridhar, A., Harrata, A. K., Esplugas, M., Onuki, S., Cai, L., & Koziel, J. A. (2009). Improving the biodegradation of organic pollutants with ozonation during biological wastewater treatment. *Ozone: Science and Engineering*, 31(2), 63–70. <https://doi.org/10.1080/01919510802668380>
- Venta, M. B., Santa, S., Broche, C., & Pérez, A. G. (2010). El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 41(3), 155–164.
- Verduzco-Martínez, J., Mercado-Hernández, R., & Predo-Rojas, C. I. (2009). Caracterización e identificación taxonómica del maguey. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2, 75–99.

www.respyn.uanl.mx/especiales/2009/ee-02-2009/documentos/06.pdf

- Vicaș, S. I., Bandici, L., Teușdea, A. C., Turcin, V., Popa, D., & Bandici, G. E. (2017). Compuestos bioactivos, capacidad antioxidante e intensidad de color en mosto y vinos derivados de uvas sometidas a tratamiento de campos eléctricos pulsados. *CYTA - Journal of Food*, 15(4), 553–562. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1317667>
- Vidal, M. F. (2015). Calidad y estabilidad microbiológica del jugo de tuna blanca (*Opuntia albicarpa*), ozonizado y presurizado. Universidad Autónoma Chapingo.
- Villaseñor, J. L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Vinicio, M., & Vega, S. (2008). la capa dE ozono. *Revista Biocenosis*, 21, 1–2.
- Wang, Z., Zhang, H., Yuan, W., Gong, W., Tang, H., Liu, B., Krohn, K., Li, L., Yi, Y., & Zhang, W. (2012). Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Food Chemistry*, 132(1), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.080>
- Yoshimura, T., Harashima, M., Kurogi, K., Suiko, M., Liu, M. C., & Sakakibara, Y. (2016). A novel procedure for the assessment of the antioxidant capacity of food components. *Analytical Biochemistry*, 507, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.002>
- Zavala, Á. G., Rivero, L. L., García García, I., & Castillejos, O. G. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 33(1). <https://doi.org/10.1590/s0864-34662007000100008>

4. COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA EL RECuento DE MESÓFILOS AEROBIOS, COLIFORMES Y LEVADURAS EN AGUAMIEL

4.1. Resumen

Debido a sus características y composición fisicoquímica, el aguamiel cuenta con una gran diversidad microbiana. La cuantificación de microorganismos es un parámetro crítico en los estudios de alimentos y bebidas, por lo tanto, se han desarrollado diversas metodologías y técnicas para su cuantificación. Es importante establecer un método apropiado para la cuantificación de microorganismos característicos de cada alimento y bebida. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue validar el método rápido (uso de placas 3M-PETRIFILM®) en comparación con el método convencional (a base de medios de cultivo) para la cuantificación de mesófilos aerobios totales (MAT), coliformes totales (CT) y levaduras totales (LT) en aguamiel; mediante un análisis de regresión lineal simple. Se inoculó un mililitro de aguamiel, previamente diluido (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) en 30 placas 3M-PETRIFILM® y en 30 medios de cultivo tradicionales. Los resultados evidenciaron que existen diferencias significativas entre el método rápido y método convencional ($p \leq 0.05$) para el recuento de MAT, CT y LT en aguamiel, con un porcentaje de concordancia entre el valor obtenido (método rápido) y el valor estandarizado (método tradicional) de 128.71, 149.99 y 105.97 %, respectivamente. Es decir, con el uso de placas 3M-PETRIFILM® para el conteo de microorganismos en aguamiel, se obtienen valores mayores de $\log_{10}\text{UFCmL}^{-1}$, en comparación con los valores estandarizados obtenidos a través del método convencional. La microbiota natural del aguamiel y la composición de las placas 3M-PETRIFILM®, son factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos y por ende en el recuento que se obtiene en cada uno de ellos. Finalmente, el uso de placas 3M-PETRIFILM® no permitió un conteo preciso de los microorganismos presentes en aguamiel.

Palabras clave: método convencional, placas 3M-PETRIFILM®

4.2. Introducción

El aguamiel se define como la savia comestible, extraída del cajete o cavidad central de plantas de agave maduras, su consumo es en fresco, fermentado o concentrado (Leal et al., 2015), es un líquido rico en carbohidratos y muy sensible a procesos fermentativos espontáneos en el propio cajete del agave, tiene un color dorado translúcido, olor a azúcares y dulces, sin presencia de espuma, y un pH estable cercano al neutro (7.0) (Chagua-Rodríguez et al., 2020; Bautista & Arias, 2008; Jurado & Sarzosa, 2009).

Debido a la composición fisicoquímica del aguamiel, existe el desarrollo de un consorcio microbiano en el propio cajete del maguey, entre los microorganismos que se pueden encontrar están las bacterias productoras de etanol y productoras de exopolisacáridos, bacterias lácticas y levaduras (Escalante et al., 2004).

Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en aguamiel, dando lugar a una fermentación, proceso que demerita la calidad del aguamiel para ser utilizado como materia prima para la elaboración de jarabe de agave (Cervantes-Contreras & Pedroza-Rodríguez, 2007).

Para evaluar la calidad del aguamiel como materia prima para la elaboración de jarabe de agave, generalmente se recurre al recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales, levaduras totales y con menor frecuencia coliformes totales.

Existen numerosos métodos para la cuantificación de microorganismos en una muestra dada, no obstante, la elección de un método para el recuento de microorganismos presentes en los alimentos y bebidas depende de la microbiota natural encontrada y la efectividad del método.

Actualmente, los métodos microbiológicos “convencionales”, son utilizados en diversos laboratorios y considerados en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológico de los alimentos, tienen la particularidad de ser laboriosos, emplear grandes cantidades de medios de cultivo y tiempo para

obtener resultados (González, 2016). Por otro lado, el desarrollo de técnicas modernas está mostrando nuevas alternativas, siendo importante conocer las ventajas de cada una de ellas para cada aplicación (Rosmini et al., 2004). La mayoría de estos métodos tienen atributos de las técnicas convencionales (especialmente la confiabilidad) y además, el tiempo entre el muestreo y los resultados es más corto (Bird et al., 2016; Feng, 1996; Fung, 1994). Entre las condiciones que cumplen los métodos rápidos están su exactitud, rapidez, costo mínimo, aceptabilidad, sencillez de manejo, fiabilidad del método, soporte técnico adecuado y un mínimo espacio requerido (Jasson, Jacxsens, Luning, Rajkovic & Uyttendaele, 2010; Martín de Santos, 2010). Es importante, conocer la efectividad de aplicar una metodología rápida para detectar la existencia de microorganismos dado que es crucial para tomar acciones correctivas en las instalaciones de procesamiento.

El uso del método 3M-Petrifilm® ha reportado ventajas con respecto al método convencional estandarizado, en ciertos factores técnicos y económicos, tal como: optimización del tiempo, poca necesidad de equipamiento e infraestructura, disminución de costos y poca generación de residuos sólidos (Apaza et al., 2018).

En este contexto, este estudio tuvo como objetivo validar el uso de un método rápido (placas 3M-Petrifilm®) para la cuantificación de mesófilos aerobios totales (MAT), coliformes totales (CT) y levaduras totales (LT) en aguamiel, en comparación con el método convencional y así, posteriormente, elegir un método apropiado para el recuento de microorganismos en aguamiel.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron muestras de 1 L de aguamiel de *Agave salmiana* cv manso y carrizo recolectadas en el municipio de Texcoco, Estado de México (19° 45" LN y 98° 47" LW, altitud de 2246 m). Durante los meses de noviembre y diciembre del 2020, matutinemente se recolectó aguamiel de plantas en producción intermedia y se colocó en botellas de vidrio, previamente esterilizadas. Se conservó y

traslado a una temperatura de aproximadamente 2 °C con el uso de hielo seco durante aproximadamente 1 h hasta su análisis.

4.4. Planeación experimental

Se ensayaron 30 repeticiones en cada uno de los tratamientos (método 3M-Petrifilm® y método convencional). Las variables respuesta evaluadas fueron: cuantificación de mesófilos aerobios totales (MAT), coliformes totales (CT) y levaduras totales (LT). En ambos métodos las observaciones de los conteos se transformaron a \log_{10} para aplicar correctamente las metodologías propuestas (Apaza et al., 2018). En las tres variables respuesta hubo repeticiones excluidas debido a la ausencia de microorganismos y por tanto observaciones con valor igual a cero. Se aplicó un modelo de regresión lineal simple, una prueba t-Student, una correlación de Pearson y el porcentaje de exactitud relativa. Ello con la finalidad de ajustar un modelo que explique el método 3M-Petrifilm® en función del convencional; así como, comparar y evaluar la asociación entre los tratamientos (método convencional y método 3M-Petrifilm®).

El modelo estadístico de la RLS expresa (Montgomery, 2013) :

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, 3, \dots, n$$

Donde:

y_i : variable respuesta

x_i : variable explicativa

ε_i : Error aleatorio \sim NI (μ , σ^2) con σ^2 homogénea.

Se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Pearson entre métodos, el cual está definido por la Ec.1 (Montgomery & Peck, 2012).

$$r_{jk} = \frac{\sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)(X_{ik} - \bar{X}_k)}{\sqrt{\sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)^2} \sqrt{\sum_i (X_{ik} - \bar{X}_k)^2}} \quad \text{(Ec.1)}$$

Donde X_{ij} es el valor de la variable i para el caso j , y \bar{X}_j es la media de todas las variables que definen el caso j .

Para la determinación de las diferencias significativas entre dos muestras pareadas se usó una prueba de t de student pareada (Ec. 2) (Hines & Montgomery, 1973).

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_0}{S_d/\sqrt{n}} \quad (\text{Ec.2})$$

Donde μ_0 es la media hipotética de la población para las diferencias, \bar{d} es la media de las diferencias de las muestras pareadas, S_d es la desviación estándar de la muestra para las diferencias de las muestras pareadas y n es el tamaño de muestra.

Finalmente, el grado de concordancia entre los valores obtenidos por el método rápido 3M-Petrifilm® y el valor de referencia aceptado (método tradicional) se calculó con la Ec.3.

$$\text{Exactitud} = \frac{\bar{X}}{\bar{X}_{ref}} * 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde \bar{X} es el valor medio de los resultados de un número n de mediciones repetidas, \bar{X}_{ref} es el valor medio de referencia.

4.3.3 Recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y levaduras totales.

Preparación de la muestra para el análisis microbiológico

Con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, el aguamiel sin tratar se diluyó decimalmente. Las primeras diluciones consistieron en diluir 25 mL de aguamiel en 225 mL de agua peptonada al 0.1 % y en las siguientes se diluyeron 10 mL de la primera dilución en 90 mL de agua peptonada al 0.1 %. Se

repitió el proceso dos veces más para obtener las siguientes diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000.

Método rápido: 3M-Petrifilm®

Una vez preparadas las muestras, se realizó el recuento de MAT, la determinación de CT y el recuento de LT con base en la metodología propuesta por la AOAC 990.12 (1990), AOAC 991.14 (2012) y AOAC 997.02 (2016), respectivamente. En el Cuadro 2 se muestra la composición de cada una de las placas 3M-Petrifilm®.

Cuadro 2. Composición química de las palcas 3M-Petrifilm®, Coliformes totales (CC), Levaduras totales (YM) y Mesófilos aerobios totales (AC).

Compuestos (g L⁻¹)	AC	CC	YM
Agar	20.0	2.5-7.5	20.0
Dextrosa	11.0		20.0
Peptona, extracto de levadura	2.0		
Peptona, caseínahidrolizado	10.0		20.0
Extracto de levadura		3.0-18.0	
Peptona (otra)	5.0	9.0	
Sulfato de magnesio	0.5		0.5
Cloruro de potasio	0.5		0.5
Sulfato, fosfato	1.0		1.0
Alginato de sodio	40.0		17.0
Piruvato de sodio <10			20.0
Triptosa		15.0	
Lactosa		10.0	
Cloruro de sodio		5.0	
Sales biliares		1.5	
Tetrazolio		1.25	
Antibióticos			0.05

Fuente: elaboración propia con datos de Meador et al. (2016) y Mach et al. (1998)

Se colocó la placa 3M-Petrifilm® en una superficie plana y nivelada, y se levantó la película superior. Con una pipeta perpendicular a la placa, se colocó 1 mL de la muestra en el centro de la película, cuidando no tocar el film inferior. Posteriormente, se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que

no se formen burbujas. Se colocó el aplicador en el film superior bien centrado sobre el inóculo. Se usó el aplicador con la cara hacia abajo (cara lisa hacia arriba), seguido, se aplicó presión de manera suave, sin mover y girar, sobre el aplicador para distribuir el inóculo por toda la zona circular. Finalmente, se incubaron las placas boca arriba, en las condiciones indicadas en el Cuadro 3, según corresponda. Para la lectura se seleccionó aquellas placas donde aparecieron entre 25 a 250 UFC.

Cuadro 3. Condiciones de temperatura y tiempo para la incubación de microorganismos en placas 3M-Petrifilm®.

Microorganismos	Temperatura	Tiempo	Características físicas de las colonias
Mesófilos aerobios totales (MAT)	35° ± 2 °C	48 h	Colonias color rojizo
Coliformes totales (CT)	35° ± 2 °C	24 h	Colonias color rojo
Levaduras totales (LT)	25 ± 1 °C	5 días	Colonias pequeñas con borde definido y de color azul-verdoso color rojo con presencia de gas

Método convencional

Una vez preparadas las diluciones con aguamiel, se realizó el recuento de MAT de acuerdo con el método propuesto por la NOM-092-SSA1-1994. La determinación de CT se realizó según lo descrito por la NOM-113-SSA1-1994 y el recuento de LT se llevó a cabo según lo indicado con la NOM-111-SSA1-1994. En el Cuadro 4 se muestra la composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados.

Cuadro 4. Composición de los medios utilizados en el método tradicional, CT: AVR B (agar bilis y rojo violeta), LT: PDA (agar papa dextrosa) y MAT: PCA (agar para métodos estándar).

Compuestos (g L⁻¹)	PCA	AVRB	PDA
Agar	15.0		15.0
Dextrosa	1.0		20.0
Digestión pancreática de caseína	5.0		
Rojo neutral		0.03	
Extracto de levadura	2.5	3.0	
Peptona (otra)		7.0	
Cloruro de sodio		5.0	
Lactosa		10.0	
Sales biliares		1.5	
Cristal violeta		0.002	
Almidón de papa			40
pH	7.0 ± 0.2	7.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2

Fuente: elaboración propia con datos de Meador et al. (2012) y Mach et al. (1998)

Se tomó una alícuota de 1 mL de aguamiel, previamente diluida y se colocó en cada una de las cajas petri, seguido se vertieron 15 mL de medio de cultivo en las cajas petri previamente inoculadas. Se homogeneizó el contenido de las cajas petri mediante un movimiento lento de izquierda a derecha y de delante hacia atrás, y se dejaron reposar hasta que solidificó el medio. Posteriormente, se invirtieron las placas y se llevaron a incubación, según el tipo de microorganismo (Cuadro 5). Para la lectura se seleccionaron aquellas placas donde aparecieron entre 25 a 250 UFC.

Cuadro 5. Condiciones de temperatura y tiempo para la incubación de microorganismos en placas Petri.

Microorganismos	Temperatura	Tiempo	Características físicas de las colonias
Mesófilos aerobios totales (MAT)	35° ± 2 °C	48 h	Colonias color blancas
Coliformes totales (CT)	35° ± 2 °C	24 h	Colonias color rojo oscuro
Levaduras totales (LT)	25 ± 1 °C	5 días	Colonias color blancas

4.5. Resultados y discusión

Mesófilos aerobios totales

Con base en los resultados obtenidos (Cuadro 6), para el conteo de mesófilos aerobios totales (MAT) en aguamiel el modelo ajustado no fue significativo y no existió correlación significativa entre ambos métodos, así mismo, hubo diferencias significativas entre el método 3M-Petrifilm® AC y el convencional ($p \leq 0.05$) con una exactitud relativa de 127.72 %. Estos resultados indican que ambos métodos reportan diferente valor de MAT y no existe asociación lineal entre ellos, tal que se registró un mayor número de colonias en 3M-Petrifilm® AC con respecto al método convencional (PCA) (Figura 3).

El mayor número de colonias obtenido por el método 3M-Petrifilm® AC puede deberse a una sobreestimación, dado que este método además de permitir el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias permite el crecimiento de algunos otros microorganismos, tal como las bacterias ácido lácticas (BAL), y el aguamiel se caracteriza por una microbiota natural compuesta generalmente por bacterias del ácido acético (AAB), levaduras y en su mayoría por bacterias ácido lácticas (BAL) (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020). Incluso los fabricantes de placas 3M- Petrifilm® (3M Microbiology, St. Paul, MN) recomiendan el uso de 3M-Petrifilm® AC para recuentos de BAL (Nero et al., 2006).

Cuadro 6. Parámetros de correlación y equivalencia entre el método 3M-Petrfilm® y método convencional para el recuento de microorganismos en aguamiel.

Microorganismos	Parámetros						
	N	Pendiente	p valor	Intercepto	Correlación de Pearson	T de Student pareada	Exactitud relativa
Mesófilos aerobios totales	28	0.03	0.89	6.02	0.03	- 10.96* 0.00	127.72 %
Coliformes totales	29	- 0.04	0.60	5.48	0.10	- 6.08* 0.00	150.25 %
Levaduras totales	27	12.11	0.000	- 32.29	0.91	- 25.33* 0.00	105.97 %

* Diferencias significativas entre los métodos para el recuento de microorganismos ($p < 0.05$).

Otro factor que pudo influir en la sobreestimación obtenida es la composición del medio de ambos métodos, en el Cuadro 4 se observa que 3M-Petrifilm® AC contiene 10 g más de dextrosa (carbohidrato fermentable que provee de carbono y energía) que en PCA, además algunos otros compuestos presentes en las placas 3M-Petrifilm® AC, tal como sulfato de magnesio y potasio que son algunos minerales presentes en medio MRS utilizados para el crecimiento de BAL.

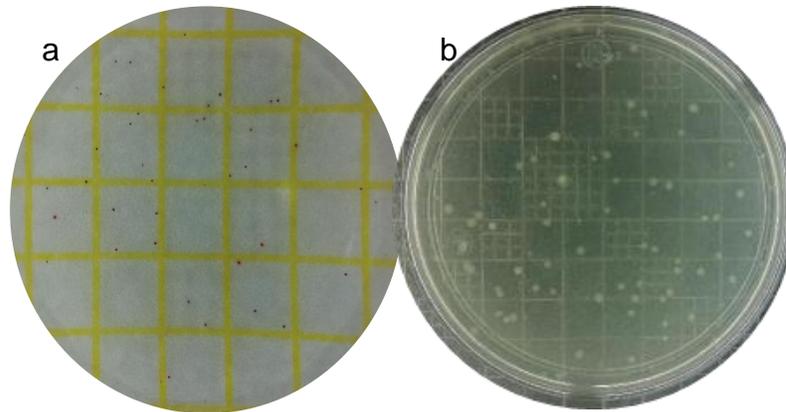


Figura 3. Comparación del crecimiento de mesófilos totales en Petrifilm AC: dilución 10^{-5} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b): dilución 10^{-3} (b).

Así mismo, se han publicado estudios considerando usar 3M-Petrifilm® AC para el recuento de BAL, pero centrados en los productos lácteos. Colombo et al. (2014) indicaron que placas 3M-Petrifilm® AC se pueden utilizar junto con medios de cultivo selectivos para permitir la enumeración de grupos específicos de BAL, específicamente *Lactobacillus casei* en leche fermentada.

Por su parte, Nero et al. (2006) demostraron que el recuento de BAL en diferentes muestras de leche en 3M-Petrifilm® AC y agar de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) no mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos métodos.

Por otro lado, Alhelfi (2016) y Bermúdez et al. (2015) reportaron para el caso de productos de cacao, en leche cruda, yogur y queso que no existieron diferencias entre el método 3M- Petrifilm® y el convencional ($p \leq 0.05$). Mientras que, en la comparación del recuento mesofílico de muestras de pescado, el método 3M-

Petrifilm® y el método del plato vertido mostraron una correlación significativa ($r = 0.991$, $p \leq 0.05$) (Hassan & Nija, 2017).

Coliformes totales

El análisis estadístico de los resultados entre los métodos comparados mostró una baja correlación de Pearson de 0.10 (Cuadro 6) y diferencias significativas entre los métodos ($p \leq 0.05$) con una exactitud relativa de 150.25 %, lo que indica una sobreestimación del uso de las placas 3M- Petrifilm® CC con respecto al uso del medio agar rojo bilis violeta (VRB). Los coliformes totales no forman parte de la microbiota natural del aguamiel, dado que son ampliamente reconocidos como indicadores bacteriológicos y son evidencia de contaminación fecal (Hernández-Morales & Poot-Delgado, 2018). Por consiguiente, existieron muestras con cero crecimiento de CT.

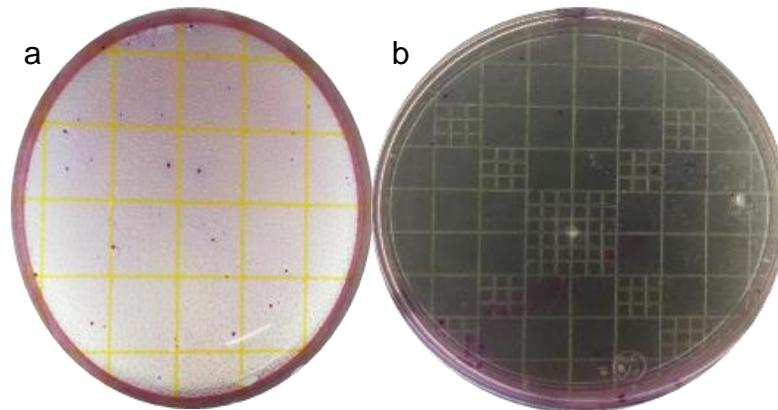


Figura 4. Comparación del crecimiento de coliformes totales en Petrifilm EC: dilución 10^{-4} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b).

Por otra parte, la sobreestimación pudo deberse a la presencia de ciertas bacterias no coliformes en placas 3M-Petrifilm® CC, ya que durante este trabajo se contabilizó las colonias rojas con y sin presencia de gas en las placas 3M-Petrifilm® CC (Figura 4). Con base en la guía del uso de 3M-Petrifilm® CC (3M Microbiology, St. Paul, MN) estas contienen un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias, este compuesto cuando es reducido por la actividad

metabólica de los microorganismos produce formazán, un pigmento rojo insoluble que se mantiene dentro de las células formando gránulos de color rojo (Baravalle et al., 2014).

Con base en lo anterior, las placas 3M-Petrifilm® CC reportan el crecimiento de colonias de coliformes y no coliformes, con la misma estructura física que las colonias de CT, con la diferencia que estas últimas presentan burbujas de gas, no obstante, en algunas ocasiones la presencia de burbujas pudo ser atribuida a un mal manejo de la siembra del inóculo sobre 3M-Petrifilm® CC. En contraste, los medios de cultivo RVB contienen indicador de pH rojo neutro cuyo fundamento demuestra que, si la lactosa es fermentada, el medio de cultivo se acidifica, causando el vire del indicador a rojo; así, las colonias de los microorganismos fermentadores de lactosa aparecen de color rojo oscuro o rosadas. Esto permite visualizar la presencia de CT, debido a que las colonias de las bacterias no fermentadoras de lactosa son transparentes, incoloras o ámbar (NOM-113-SSA1-1994).

Rojas et al. (2020) indicaron que 3M- Petrifilm® CC permite la visualización del crecimiento de bacterias Gram negativas no coliformes después de 48 h de incubación, tal como *Pseudomonas*, microorganismo que forma parte de la microbiota natural del aguamiel. Por su parte, De La Cruz (2013) a través de un análisis de agua observó que la técnica de 3M- Petrifilm® detectó mayor número de coliformes totales que en la técnica de membrana filtrante.

Por otra parte, dicha sobreestimación o variación en el conteo como indican Apaza et al., (2018) se puede deber a muchos factores, por un lado, relacionados con la matriz del alimento y por el otro lado las condiciones de laboratorio para poder realizar el recuento de este microorganismo en un alimento dado.

Levaduras totales

Las levaduras totales constituyen uno de los grupos de los microorganismos encontrados en la microbiota natural del aguamiel (Herrera-Solórzano et al., 2008). El uso del método rápido con 3M-Petrifilm YM para levaduras en alimentos y bebidas, a pesar de ofrecer la ventaja de ser de fácil uso, requerir de poco tiempo en preparación y emisión de resultados, para el caso del aguamiel este método evidenció una diferencia significativa con respecto al método convencional.

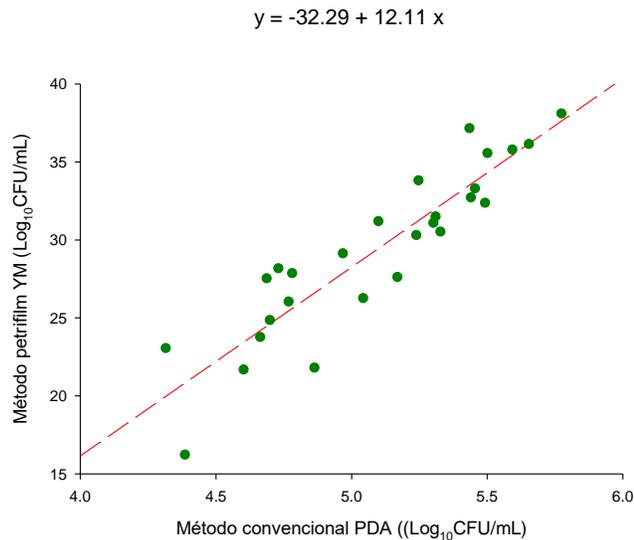


Figura 5. Regresión lineal de los recuentos de mesófilos aerobios totales (a), coliformes totales (b) y levaduras totales (c) obtenidos en 3M-Petrifilm® y método convencional.

El análisis estadístico de los resultados entre los métodos comparados mostró un coeficiente de correlación ($R^2 = 0.82$) mayor a la correlación que se obtuvo para MAE y CT (Figura 5).

Sin embargo, la prueba de t indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los métodos comparados y una exactitud relativa de 105.97 %, lo que indica una sobreestimación del uso de 3M- Petrifilm® YM sobre el uso del medio PDA (Figura 6).

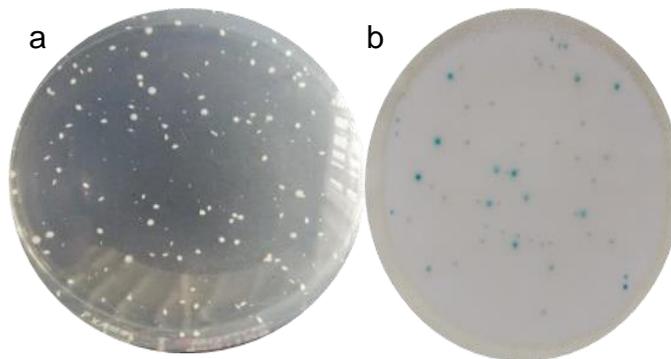


Figura 6. Comparación del crecimiento de levaduras totales en Petrifilm YM: dilución 10^{-4} (a) y método convencional: dilución 10^{-3} (b)

La causa de estos resultados podría atribuirse a la composición de las placas 3M-Petrifilm® YM, como Teramura et al. (2015) indicaron que el sustrato cromogénico para la fosfatasa que se incorpora en los sistemas de cultivo secos, en este caso 3M- Petrifilm® YM, provoca la coloración del medio por las enzimas alimentarias e interfiere con la enumeración. Por otra parte, 3M-Petrifilm® YM contiene algunos otros componentes que las levaduras utilizan para su metabolismo tales como: fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, hierro, sodio, potasio y otros minerales (Mansilla & Álvarez, 2005).

Finalmente, además de los factores mencionados anteriormente existen otros factores externos a considerar tal como los tiempos de inoculación y manipulación, que probablemente incidieron en la recuperación y enumeración de colonias, causando esta diferencia entre ambos métodos (Amer et al., 2000).

4.6. Conclusiones

El método convencional y el método 3M-Petrifilm® resultaron diferentes ($p \leq 0.05$) sobre la cuantificación de MAT, CT y LT. El uso alternativo de placas 3M-Petrifilm® para el conteo de CT, MAT y LT en aguamiel demostró un mayor número de CFU mL⁻¹ con respecto al recuento con el método convencional. El uso de placas 3M-Petrifilm® para el recuento de los diversos microorganismos presentes en aguamiel no es apropiado, debido a que sobreestiman el recuento de los microorganismos en comparación con el método convencional estandarizado. Para la utilización de este método rápido (3M-Petrifilm®) es

necesario tomar en cuenta diversos factores tal como la composición de los medios, su manipulación y uso.

4.7. Literatura citada

- Alhelfi, N. (2016). Assessment of The Efficiency of Petrifim Method in Study of Bacteriological Quality of Some Homemade Dairy P Assessment of the Efficiency of Petrifim Method in Study of Bacteriological Quality of Some Homemade Dairy Products in. *Food Science Anda Quality Management*, 54(November), 39–46.
- Amer, L., De Battista, G., Medvedeff, M., & Bargardi, S. (2000). Evaluación del método petrifilm para la determinación del recuento de microorganismos aerobios mesofilos totales, en drogas vegetales. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 41(4), 383-386.
- AOAC 990.12. (1990). AOAC Official Method 990.12. Aerobic Plate Count in Foods. Dry Rehydratable Film. (Petrifilmä Aerobic Count Plate) Method. First Action.
- AOAC 991.14 (2012). AOAC Official Method 991.14. Meat and meat products. Determination of total coliforms. Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC 997.02 (2016). AOAC Official Method 997.02. Métodos oficiales de análisis International. Determinación de aerobios mesófilos, mohos y levaduras.
- Apaza Paco, J. P., Aspillaga Sánchez, H. L., & ESPADA SILVA, A. N. G. É. L. I. C. A. (2018). Evaluación de los indicadores de desempeño de 3M Petrifilm Staph Express (STX) frente a la norma ISO 6888-1: 2003 en el recuento de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos por contaminación artificial. *Revista CON-CIENCIA*, 6(1), 15-26.
- Baravalle, M. E., Stiefel, S., Gumiy, D., Canalis, M., Siroski, P., Picco, E., Ortega, H., & Formentini, E. (2014). Desarrollo de un método colorimétrico en microplaca para determinar la cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus*. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 12(1/2), 113–127. <https://doi.org/10.14409/favecv.v12i1/2.4551>
- Bautista, N., & Arias, G. C. (2008). Estudio químico bromatológico de aguamiel de *Agave americana* L.(Maguey). *Ciencia e Investigación*, 11(2), 46–51.
- Bermúdez, D. I., Antonio, M., Alcivar, Z., Isabel, M., Lucas, B., Fernando, E., & Vera, S. (2015). Comparación de métodos 3m-petrifilm y convencional para conteo rápido de aerobios en productos de cacao.

- Comparison of 3m-petrifilm and conventional methods for quick counting of aerobics in cocoa products. 60, 114–118.
- Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., & Jechorek, R. (2016). Evaluation of the 3MTM petrifilm™ rapid aerobic count plate for the enumeration of aerobic bacteria: Collaborative study, first action 2015.13. *Journal of AOAC International*, 99(3), 664–675. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0260>
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). El pulque : características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman . *Nova*, 5(8), 135–146.
- Colombo, M., de Oliveira, A. E. Z., de Carvalho, A. F., & Nero, L. A. (2014). Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food microbiology*, 39, 89-95.
- De La Cruz, L. A. (2013). Evaluación de tres técnicas microbiológicas utilizadas para detectar coliformes totales y fecales en muestras de agua. *Visión Antataura*, 1(1), 101–110.
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Feng, P. (1996). Emergence of Rapid Methods for Identifying Microbial Pathogens in Foods. *Journal of AOAC International*, 79(3), 809–812. <https://doi.org/10.1093/jaoac/79.3.809>
- Fung, D. Y. C. (1994). Rapid methods and automation in food microbiology: A review. *Food Reviews International*, 10(3), 357–375. <https://doi.org/10.1080/87559129409541006>
- González, M. (2016). *Verificación del método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparado con el método estándar de recuento en placa por vertido, para el recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en productos terminados y materias primas en una industria de alimentos deshidratados* (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hernández-Morales, S. G., & Poot-Delgado, C. A. (2018). Coliformes Totales en Malecón Turístico Coliformes Totales en Malecón Turístico. *Conciencia Tecnológica*, 55, 14–18.
- Hassan, F., & Nija, K. V. (2017). Evaluation of dry rehydratable film (3MTM petrifilm™) method for microbial enumeration in fish samples
- Herrera-Solórzano, M., Lappe-Oliveras, P., & Wachter-Rodarte, C.

- (2008). Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido-lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. *VII simposio de producción de alcoholes y levaduras*.
- Hines, W. W., & Montgomery, D. C. (1973). Probability and Statistics in Engineering and Management Science. In *Applied Statistics* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.2307/2346312>
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6), 710–730.
- Jurado, L. S. E., & Sarzosa, P. X. S. (2009). Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya n la producción de miel y licor de cabuya (Escuela Politécnica Nacional). <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1693/1/CD-2305.pdf>
- Leal-Diaz, A., Santos-zea, L., Cecilia, H., Guajardo-flores, D., Alejandra, J., & Otho, S. (2015). Effect of Agave americana and Agave salmiana ripeness on saponin content from aguamiel (agave sap). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3924–3930.
- Mach, P. A., Hesselroth, K. E., Adams, C. A., & Schwab, D. L. (1998). United States Patent.
- Mansilla, A. A. H., & Álvarez, C. R. (2005). Evaluación preliminar del crecimiento y la esporulación de *Aschersonia aleyrodis* Webber en medios de cultivo convencionales. *Fitosanidad*, 9(3), 61–63.
- Martín de Santos, R. (2010). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 67–98.
- Meador, D. P., Fisher, P. R., & Teplitski, M. (2012). The Use of Petrifilms to Quantify Aerobic Bacteria in Irrigation Water. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 125(0), 340–342. <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/84012>
- Meador, D. P., Fisher, P. R., Guy, C. L., Harmon, P. F., Peres, N. A., & Teplitski, M. (2016). Use of Dehydrated Agar to Estimate Microbial Water Quality for Horticulture Irrigation. *Journal of Environmental Quality*, 45(4), 1445–1451. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.03.0130>
- Montgomery, D. C. (2013). *Design and Analysis of Experiments Eighth Edition*.
- Montgomery, D. C., & Peck, E. A. (2012). *Introducción to linear Regression Analysis*.
- Nero, L. A., Beloti, V., De Aguiar Ferreira Barros, M., Ortolani, M. B. T., Tamanini, R., & De Melo Franco, B. D. G. (2006). Comparison of petrifilm aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and*

- Automation in Microbiology, 14(3), 249–257.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2006.00050.x>
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Microorganismos Colifórmes Totales en Placa.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, 136, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
- Rojas, A., Murphy, S. I., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2020). Short communication: Coliform Petrifilm as an alternative method for detecting total gram-negative bacteria in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5043–5046. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17792>
- Rosmini, M. R., Signorini, M. L., Schneider, R., & Bonazza, J. C. (2004). Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control*, 15(1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00005-7)
- Teramura, H., Ushiyama, M., & Ogihara, H. (2015). Evaluation of a novel dry sheet culture method (Sanita-kunR) for rapid enumeration of yeasts and molds in foods. *Journal of Microbiological Methods*, 109, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.017>

5. EFECTO DEL OZONO SOBRE LA POBLACIÓN TOTAL DE MICROORGANISMOS Y PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS EN AGUAMIEL.

5.1. Resumen

El aguamiel constituye una matriz favorable para el desarrollo y crecimiento de microorganismos autóctonos, por lo cual esta bebida tiende a la fermentación y junto con esto existe una pérdida de sus propiedades físicoquímicas. El uso de tecnologías emergentes ha mostrado la disminución de microorganismos y conservación de las características físicoquímicas de los alimentos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de ozonización (0, 3, 6, 9 y 12 min) en la reducción de la actividad microbiana y preservación del contenido de sólidos solubles totales (SST) y pH del aguamiel de *A. salmiana*. Se evaluó a las 0, 4, 8 y 12 h de almacenamiento el efecto de cinco niveles de tiempo (0, 3, 6, 9 y 12 min) de aplicación de ozono sobre la población total de microorganismos (PTM), pH y sólidos solubles totales (SST) en aguamiel. Se aplicó un modelo mixto bajo un diseño de bloques completos aleatorios y una prueba de Tukey–Kramer ($\alpha=0.05$). En cada una de las muestras se visualizaron dos grupos de microorganismos: mayormente bacterias ácido-lácticas (BAL) entre ellos, *lactobacilos* y *leuconostoc*; y en menor cantidad levaduras. A lo largo de 12 h, la aplicación de 12 min de ozono permitió una mayor reducción de la PTM de 7.26 a 6.85 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$ ($p \leq 0.05$). En cuanto a los parámetros físicoquímicos, hubo un efecto significativo del tiempo de almacenamiento ($p \leq 0.05$), que causó una disminución del valor del pH de 4.78 a 3.62 y contenido de SST de 12.73 a 12.28 °Bx. Finalmente, la aplicación de 12 min de ozono permitió disminuir la PTM a lo largo de 12 h de almacenamiento, sin embargo, este tratamiento no logró conservar el contenido de SST y pH del aguamiel durante el almacenamiento.

Palabras clave: BAL, levaduras, ozono, microorganismos.

5.2. Introducción

El maguey pulquero (*A. salmiana*) es una planta de la familia Agavaceae, crece en el clima semiseco y frío de la altiplanicie mexicana (Espíndola-Sotres, Trejo-Márquez, Lira-Vargas, Pascual-Bustamante, 2018). Dicha variedad se utiliza principalmente para la producción de aguamiel, obtenido mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero (Espíndola-Sotres et al., 2018; NMX-V-022-1972).

En aguamiel el contenido de azúcares se encuentra generalmente en un rango de 7 a 14 % (Lappe-Oliveras et al., 2008). Con base en sus características fisicoquímicas, es un líquido turbio amarillento pálido, pH cercano a la neutralidad, compuesto en su mayoría por agua y azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa). También contiene bajas cantidades de proteínas, polisacáridos (inulina) y minerales (Castro-Díaz & Guerrero-Beltrán, 2021; Lappe-Oliveras et al., 2008).

Debido a sus características, el aguamiel es un sustrato favorable para el desarrollo de microorganismos lo que ocasiona una corta vida de anaquel, al ser un producto altamente susceptible a fermentación, proceso que inicia aproximadamente 2 h después de haber sido cosechado y almacenado a temperatura ambiente (Espíndola-Sotres et al., 2018).

En la actualidad, se busca la conservación de los alimentos frescos a través del uso de tecnologías que logren prolongar la vida útil y la calidad de los productos, además que puedan utilizarse como potenciadores de sustancias que mejoren las propiedades nutricionales de los mismos (Ramos-García, Romero-Bastida & Bautista-Baños, 2018).

Actualmente, el uso de ozono es una tecnología con alto potencial para alargar la vida útil de los alimentos altamente perecederos, debido a su elevado poder oxidante, el ozono elimina tanto los microorganismos patógenos como los oportunistas presentes en los alimentos sin dejar agentes químicos residuales y

sin afectar las propiedades organolépticas de los alimentos tratados (Pérez-Calvo, 2019). De esta manera, el ozono podría ser una alternativa para disminuir o eliminar el amplio consorcio de microorganismos que presenta el aguamiel, y al mismo tiempo se logre preservar sus propiedades benéficas. Además, el uso de ozono ha sido aprobado para su utilización en contacto con alimentos por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) (Andrade et al., 2018).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de aplicación ozono (0, 3, 6, 9 y 12 min) sobre la estabilidad microbiológica y fisicoquímica de aguamiel de *A. salmiana*, mediante la cuantificación de la población total de microorganismos, pH y sólidos solubles totales en aguamiel de *A. salmiana*, a lo largo de 12 h de almacenamiento.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Material vegetal

Se utilizaron muestras de 1 L de aguamiel de *A. salmiana* cv. Ayoteco del municipio de Texcoco, Estado de México. Durante los meses de marzo y abril del 2021, el aguamiel se recolectó matutinemente de plantas en producción intermedia durante 5 días. El aguamiel se colocó en botellas de vidrio, previamente esterilizadas. Se conservó y traslado a una temperatura de aproximadamente 2 °C con el uso de hielo seco durante aproximadamente 1 h hasta su análisis.

5.4. Planeación experimental

Se utilizó un modelo mixto bajo un diseño de bloques completos aleatorios cuyo factor de bloqueo fue el día de recolecta y una prueba de Tukey–Kramer ($\alpha=0.05$). Se ensayaron cinco repeticiones. La unidad experimental se constituyó de 100 mL de aguamiel colocados en probetas de vidrio.

Se evaluó el efecto de cinco niveles de aplicación de ozono (0, 3, 6, 9 y 12 minutos) y se midió la población total de microorganismos, pH y SST a las 0, 4,

8 y 12 h de almacenamiento. El modelo estadístico se expresa (Littell et al., 2006):

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \alpha_k + (\tau\alpha)_{jk} + \delta_{jk} + \epsilon_{jk}$$

$i = 1, 2, \dots, r.$
 $j = 1, 2, \dots, p.$
 $k = 1, 2, \dots, t.$

Donde y_{ijk} es la respuesta en el i -ésimo bloque con el j -ésimo tratamiento en el k -ésimo tiempo, μ es la media general, τ_j es el efecto del j -ésimo tratamiento, β_i es el efecto del i -ésimo bloque, α_k es el efecto a leatorio del k -ésimo tiempo, $(\tau\alpha)_{jk}$ es el efecto de la interacción del j -ésimo tratamiento y el k -ésimo tiempo, ϵ_{ijk} es el error aleatorio asociado al i -ésimo bloque con el j -ésimo tratamiento en el k -ésimo tiempo y δ_{jk} es el error aleatorio del factor tiempo. Modelo bajo los supuestos $\epsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma_\epsilon^2)$ y $\delta_{jk} \sim NI(0, \sigma_\delta^2)$ con σ^2 homogénea.

5.4.1. Aplicación de ozono

La ozonización del aguamiel se efectuó con un equipo (Biozon, PTA mini, México) con una producción de ozono de 1.2 g h^{-1} . El aguamiel fue colocado en probetas de vidrio de 300 mL, la inyección de ozono se realizó a través de una manguera de polipropileno con orificios la cual se introdujo a través de la probeta de vidrio para lograr un mayor contacto del ozono con la muestra.

5.4.2. Recuento de la población total de microorganismos en aguamiel.

a) Recuento de la población total de microorganismos

El recuento total de la población de microorganismos se realizó mediante el uso de la cámara Neubauer (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Se tomó 1 mL de cristal violeta y se diluyó en 9 mL de agua esterilizada (Gómez & Martínez, 2021). Seguido, se tomó 0.5 mL de muestra y se le añadió 0.5 mL de cristal violeta, previamente diluido. Con el uso de microscopio óptico y el objetivo a 100x, se contó el número total de microorganismos de cinco cuadrantes y se calculó el promedio. Posteriormente, se utilizó la siguiente fórmula (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

$$PTM = (\bar{Y})(FD)(2)(10,000)$$

Donde:

- *PTM* es la población total de microorganismos
- \bar{Y} es el promedio de cinco cuadrantes
- *FD* es el factor de dilución de la muestra
- 2 corresponde al factor de dilución de la tinción

b) Recuento de células viables

Se realizó el recuento de mesófilos aerobios totales de acuerdo con la metodología propuesta por la NOM-092-SSA1-1994, así como, el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) mediante el uso de Placas BAL 3M-Petrifilm®.

5.4.3. Variables fisicoquímicas

pH. Se midió con un potenciómetro (H1 2221 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) según lo descrito por la 981.12-AOAC (2019).

Sólidos solubles totales. Se determinó con la ayuda de un refractómetro digital portátil PAL-1 según lo indicado en 932.12-AOAC (2010).

5.5. Resultados y discusión

Efecto del ozono sobre la población total de microorganismos

Se identificaron dos grupos de microorganismos en aguamiel, bacterias ácido-lácticas y levaduras, y con menor frecuencia se lograron visualizar algunos bacilos (Figura 7). En el producto obtenido de la fermentación del aguamiel se han reportado la presencia de *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Escalante, 2004). Por su parte, Torres-Rodríguez et al. (2014) reportaron que la diversidad microbiana presente en bebidas fermentadas tradicionales son las bacterias ácido-lácticas (BAL) y que en aguamiel la BAL *L. mesenteroides* es una de las más importantes para lograr la fermentación.

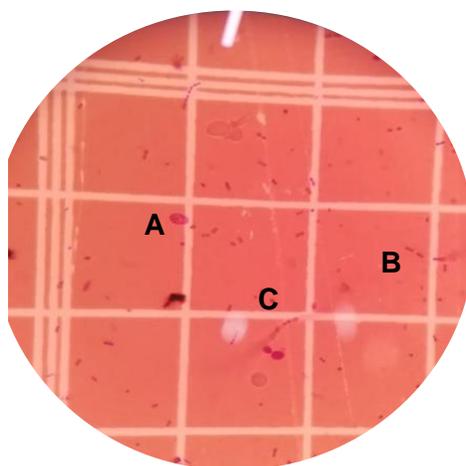


Figura 7. Visualización de microorganismos en la Cámara Neubauer, al microscopio óptico 100x. *Levaduras* (A), Bacterias ácido-lácticas (B) y (C) *Leuconostoc*.

De igual modo, en esta investigación dentro del grupo BAL encontrado en el aguamiel se identificó la presencia de microorganismos del género *Leuconostoc* (Figura 7C). Escalante et al. (2004) reportaron una importante diversidad de BAL, compuesta de especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, en muestras de aguamiel y pulque de diferentes regiones del centro de México. Por su parte, Valadez-Blanco et al. (2012) reportaron la presencia de poblaciones de BAL aerobias y anaerobias, tanto en aguamiel como en pulque en un rango de 6×10^7 a 2×10^{11} CFU mL⁻¹.

El efecto de la aplicación de ozono sobre la población total de microorganismos mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos a lo largo de 12 h de almacenamiento. La exposición de 12 min de ozono logró mantener una mayor reducción significativa ($p \leq 0.05$) de microorganismos (de 7.26 a 6.85 log₁₀mL⁻¹) aproximadamente un 3.85 %, con respecto al testigo ¹ a lo largo de 12 h. Al término de 12 h de almacenamiento la mayor reducción de PTM, con respecto al testigo, se presentó con 6 y 12 min de aplicación de ozono, obteniendo una población total de 6.88 y 6.85 log₁₀mL⁻¹, respectivamente (Figura 8).

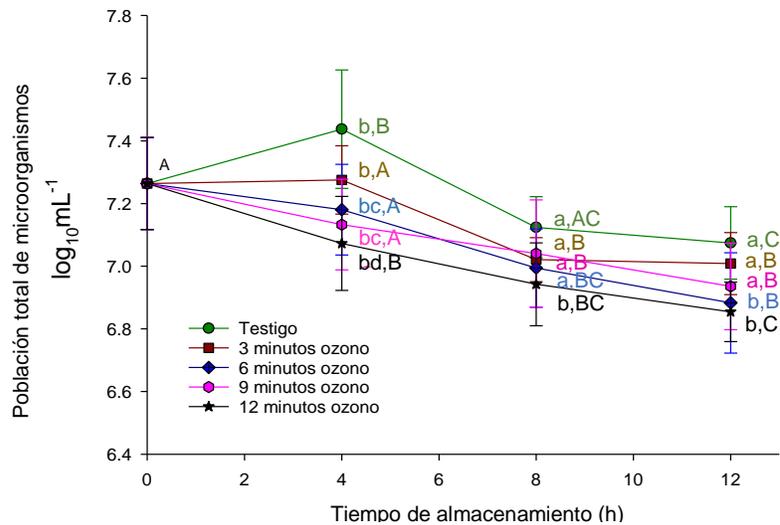


Figura 8. Población total de microorganismos ($\log_{10}\text{mL}^{-1}$) en aguamiel de *A. salmiana* tratada con diferentes niveles de ozonización: (0, 3, 6, 9 y 12 min) y analizada en diferentes tiempos de almacenamiento (0, 4, 8 y 12 h). Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Cho et al. (2010) indican que el daño a los microorganismos por ozono ocurre principalmente a través del contacto sobre la membrana celular y los componentes de la pared, afectando las glicoproteínas y / o glicolípidos de la membrana. Así mismo, la disminución de microorganismos en aguamiel se pudo deber a que el ozono a pH bajos tiene mayor eficacia sobre la reducción de microorganismos, debido a una acción directa del ozono (por vía molecular) y a través de una reacción muy selectiva (Bataller et al., 2010).

El Cuadro 7 reporta el número de células viables obtenido al terminó de 12 h. La mayor exposición de ozono permitió una mayor reducción de microorganismos, con respecto al testigo, de 3.68 y 14.81 % de bacterias ácido-lácticas ($\text{Log}_{10}\text{UFCmL}^{-1}$) y mesófilos aerobios totales ($\text{Log}_{10}\text{UFCmL}^{-1}$), respectivamente.

Cuadro 7. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: bacterias ácido-lácticas (BAL), mesófilos aerobios totales (MAT), y porcentajes de reducción microbiológica en aguamiel con diferentes tiempos de ozono.

Tratamientos	BAL (Log ₁₀ UFCmL ⁻¹)	MAT (Log ₁₀ UFCmL ⁻¹)	PTM (Log ₁₀ mL ⁻¹)
Testigo	6.66	6.32	7.44
12 min de ozono	6.41	5.38	7.06
(%)	3.68	14.81	5.19

Nota: % Porcentaje de reducción microbiológica

Diversos factores, tales como, el método de aplicación, la dosis de ozono, el tiempo de tratamiento, la temperatura, incluso la composición del aguamiel, son determinantes para el nivel de oxidación generado y pudieron haber influido en los bajos porcentajes de reducción microbiana registrados en el número de células viables (Ayranci et al., 2019). Aunado a lo anterior, la eficacia del ozono gaseoso para la inactivación de microorganismos en alimentos depende en gran medida del ozono residual en el medio más que de la tasa de generación de ozono, y también esta significativamente influenciada por el contenido de sólidos presentes en los alimentos (Asokapandian et al., 2018).

Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros pH y sólidos solubles totales no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$), las diferencias se presentaron entre los diferentes tiempos de almacenamiento (Cuadro 8). A partir de las 4 h, el pH del aguamiel mostró un promedio de 3.75. No obstante, el testigo a partir de las 8 h presentó una disminución significativa de pH de 3.74 a 3.64. Oner y Demirci (2016) indican que el pH tiene un efecto significativo sobre la capacidad del ozono para reducir microorganismos, con una mayor tasa de inactivación a valores de pH más bajos. Del mismo modo, Alvares, Diaper y Parsons (2001) encontraron que se produce una disminución de la eficiencia del ozono a pH alto, dado que existe una mayor auto-descomposición. Patil et al. (2010) observaron que la inactivación de *E. coli* en jugo de manzana fue mucho más rápido a pH bajos que

a pH altos. Así mismo, afirman que la inactivación depende del caudal de entrada de ozono y se mejora positivamente a pH ácido.

Por otra parte, los sólidos solubles totales disminuyeron consistentemente a lo largo del almacenamiento, sin encontrarse diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes niveles de aplicación de ozono. La concentración de SST logró mantenerse estable a partir de las 4 h de almacenamiento en un valor promedio de 12.33 °Bx, aproximadamente (Cuadro 8). Miller et al. (2013) indicaron que de manera general no se observan disminuciones significativas en el contenido total de azúcar en frutas y verduras después de tratamientos con agua que contiene ozono o cuando se aplicó un tratamiento con ozono gaseoso a corto plazo. Por su parte, Bataller et al., (2010) destacan que con sustancias orgánicas e inorgánicas el ozono reacciona directamente (por vía molecular). Incluso se ha reportado el uso de ozono para la degradación de la materia orgánica presente en aguas hospitalarias (Penagos, López & Chaparro, 2012). Así mismo, Gonçalves & Paiva (2004) mencionan que el ozono tiene la capacidad de degradar compuestos orgánicos.

Cuadro 8. Promedios y desviaciones estándares del contenido de sólidos solubles y pH de aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo exposición de ozono.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)				
		0	3	6	9	12
pH	0	4.78 ± 0.93 a,A	4.78 ± 0.93 a,A	4.78 ± 0.93 a,A	4.78 ± 0.93 a,A	4.78 ± 0.93 a,A
	4	3.92 ± 0.26 a,B	3.91 ± 0.24 a,B	3.90 ± 0.24 a,B	3.91 ± 0.27 a,B	3.98 ± 0.32 a,B
	8	3.74 ± 0.34 a,C	3.72 ± 0.34 a,C	3.67 ± 0.34 a,C	3.67 ± 0.33 a,C	3.73 ± 0.40 a,C
	12	3.64 ± 0.34 a,C	3.64 ± 0.34 a,C	3.60 ± 0.35 a,C	3.59 ± 0.35 a,C	3.64 ± 0.43 a,C
SST	0	12.73 ± 1.14 a,A	12.73 ± 1.14 a,A	12.73 ± 1.14 a,A	12.73 ± 1.14 a,A	12.73 ± 1.14 a,A
	4	12.40 ± 1.04 a,B	12.53 ± 1.22 a,B	12.58 ± 1.28 a,B	12.55 ± 1.40 a,B	12.53 ± 1.38 a,B
	8	12.18 ± 0.84 a,C	12.33 ± 1.22 a,C	12.07 ± 0.72 a,C	12.17 ± 1.08 a,C	12.22 ± 0.98 a,C
	12	12.13 ± 0.90 a,D	12.20 ± 1.00 a,D	12.53 ± 0.93 a,D	12.23 ± 0.97 a,D	12.33 ± 0.88 a,D

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min)

5.6. Conclusión

El efecto de la aplicación de 12 min de ozono en aguamiel logró mantener una mayor estabilidad microbiológica a través de una reducción de microorganismos de 7.26 a 6.85 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$ ($p \leq 0.05$) durante 12 h. El efecto del tiempo de almacenamiento fue significativo ($p \leq 0.05$) sobre el contenido de sólidos solubles totales, y sobre el pH.

5.7. Literatura citada

- AOAC. (2019). Association of official analytical chemists. Official method 981.12. Determination of ph. official methods of the aoac international, 21th ed. maryland/usa: AOAC International.
- AOAC. (2010). Association of official analytical chemists. Official Method 932.12. Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products. In A. International, Official Method of Analysis. Gaithersburgs: AOAC International.
- Alvares, A. B. C., Diaper, C., & Parsons, S. A. (2001). Partial Oxidation by Ozone to Remove Recalcitrance from Wastewaters - a Review. *Environmental Technology*, 22(4), 37–41. <https://doi.org/10.1080/09593332208618273>
- Andrade, M. J., Guijarro, M., Jara, S., Narváez, P., Moreno, C., & Concellón, A. (2018). Efecto del tratamiento con ozono gaseoso sobre la calidad fisicoquímica y capacidad antioxidante de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(2). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541004>
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, January, 10. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Asokapandian, S., Periasamy, S., & Swamy, G. J. (2018). Ozone for Fruit Juice Preservation. In *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00025-4>
- Ayranci, U. G., Ozunlu, O., Ergezer, H., Karaca, H., Ayranci, U. G., Ozunlu, O., Ergezer, H., & Karaca, H. (2019). Effects of Ozone Treatment on Microbiological Quality and Physicochemical Properties of Turkey Breast Meat Effects of Ozone Treatment on Microbiological Quality and Physicochemical Properties of Turkey

- Breast Meat. *Ozone: Science & Engineering*, 0(0), 1–9.
<https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1653168>
- Bataller–Venta, M., Santa Cruz–Broche, S., & García–Pérez, M. A. (2010). El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(3), 155-164.
- Castro-Díaz, A. S., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2021). Efecto de luz ultravioleta-C y ultrafiltración sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales de savia de Agave salmiana almacenada. *Información Tecnológica*, 32(4), 65–76.
<https://doi.org/10.4067/s0718-07642021000400065>
- Cho, M., Kim, J., Kim, J. Y., Yoon, J., & Kim, J. H. (2010). Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Research*, 44(11), 3410–3418.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- Gómez, C. A. & Martínez, R.S. (2021). Técnica de tinción implementada en el laboratorio de microbiología de alimentos. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.
- Gonçalves, A. A., & Paiva, F. G. (2004). El ozono como agente antiséptico en la industria pesquera. *Infopesca Internacional*, 31(1), 345-367.
- Ramos-García, M. Romero-Bastida, C., & Bautista-Baños, S. (2018). Almidón modificado: Propiedades y usos como recubrimientos comestibles para la conservación de frutas y hortalizas frescas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19, 30–44.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612003>
- Escalante, A., Elena Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Espíndola-Sotres, V., Trejo-Márquez, M. A., Lira-Vargas, A. A., & Pascual-Bustamante, S. (2018). Caracterización de aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(74), 522–528.
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume3/4/9/87.pdf>
- 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 nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>

- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., & Schabenberger, O. (2006). SAS for mixed models. SAS Institute. Inc., Cary, NC, 814.
- Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>
- Norma Oficial Mexicana (1994). NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México, D.F., Diario Oficial de la Federación
- NMX. (1972)., NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hidromiel. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas, (2020).
- Oner, M. E., & Demirci, A. (2016). Ozone for Food Decontamination : Theory and Applications *. In *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00033-9>
- Patil, S., Valdramidis, V. P., Cullen, P. J., Frias, J., & Bourke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiology*, 27(6), 835–840. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.002>
- Penagos, D. G., López, J. O., & CHAPARRO, T. R. (2012). Remoción de la materia orgánica y toxicidad en aguas residuales hospitalarias aplicando ozono. *Dyna*, 79(173), 109-115.
- Pérez-Calvo, M. (2019). Sanitation With Ozone. In *Gases in Agro-Food Processes* (Academic P, pp. 561–567). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812465-9.00023-2>
- Ramos-García, de Lorena., Romero-Bastida, M. & Bautista-Baños, S. (2018). Almidón modificado: Propiedades y usos como recubrimientos comestibles para la conservación de frutas y hortalizas frescas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19, 30–44. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612003>
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

6. IMPACTO DE LA APLICACIÓN DE OZONO PARA LA VIDA DE ANAQUEL DE AGUAMIEL.

6.1. Resumen

Debido a la composición del aguamiel, existe el desarrollo de un consorcio microbiano, que da lugar a una fermentación y disminución de los compuestos bioactivos del aguamiel. De esta manera, la fermentación afecta la calidad del aguamiel para ser utilizado como materia prima para la elaboración de jarabe de agave. El uso de ozono ha mostrado tener la capacidad de alargar la vida de anaquel y obtener una mayor retención de los compuestos bioactivos de los alimentos y bebidas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la estabilidad fisicoquímica, nutracéutica y producción de etanol en aguamiel. Se evaluó el efecto de tres niveles de tiempo (0, 6 y 12 min) de aplicación de ozono y el efecto de la reozonización (a las 48 h de tiempo de almacenamiento) en aguamiel sobre la población total de microorganismos (PTM), pH, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT), etanol (% v/v), actividad antioxidante (AA) y compuestos fenólicos solubles totales (CF) a lo largo de 72 h (25.44 ± 1.18 °C). Se empleó un modelo mixto bajo un diseño de bloques completos aleatorios y una prueba de Tukey–Kramer ($\alpha=0.05$). A lo largo de 48 h de almacenamiento, la aplicación de ozono en aguamiel mantuvo una baja PTM ($p \leq 0.05$) (entre 6.10 y 6.54 $\log_{10}\text{mL}^{-1}$) y actividad antioxidante (AA), con respecto al testigo. Por otra parte, a mayor tiempo de almacenamiento, el pH, los SST, los CF y la AA, disminuyeron. En cuanto a la reozonización se evidenció una disminución de la AA del aguamiel. Finalmente, la aplicación del ozono logró mantener una baja PTM con respecto al testigo durante 48 h, sin embargo, no conservó las propiedades fisicoquímicas y nutracéuticas del aguamiel a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: reozonización, potencial nutracéutico, estabilidad microbiológica.

6.2. Introducción

El aguamiel es la savia extraída de varias especies de agaves, principalmente de *A. atrovirens*, *A. salmiana*, *A. americana* y *A. potatorum* (Sánchez, 2017). Generalmente, la producción del aguamiel se destina a elaboración del pulque, sin embargo, hoy en día una alternativa de mayor aprovechamiento es la elaboración de concentrado de aguamiel (miel de maguey) (Chagua-Rodríguez et al., 2020; Valadez-Blanco et al., 2012).

Al ser el aguamiel la materia prima principal para la elaboración de miel de maguey es necesario asegurar su calidad y preservación de compuestos bioactivos a lo largo del tiempo de almacenamiento (Inocente-Quiroz et al., 2021). De este modo, para garantizar la vida de anaquel de un alimento es fundamental partir de materias primas de calidad, conocer sus características y requerimientos, por tal motivo, es fundamental conocer parámetros como la carga microbiológica, los procesos bioquímicos y metabólicos involucrados, el porcentaje de acidez, el pH y entre otros (Kader, 2002).

Los alimentos al exponerse a agentes químicos y biológicos, son susceptibles a cambios físicos, enzimáticos e interacciones que influyen sobre el procesado, la calidad final y sobre todo la vida de anaquel, además, la tendencia de los consumidores es elegir alimentos frescos, de calidad organoléptica y con potencial funcional, por sus bioactivos (Boatella et al., 2004; Rodríguez & de Hernández, 2021). En este contexto, el ozono ofrece a la industria alimentaria un agente limpiador y desinfectante alternativo o complementario, se ha informado de su eficacia para la limpieza física, química y biológica dentro de las unidades de procesamiento de alimentos (O'Donnell et al., 2012). Y así mismo, se ha reportado que el ozono tiene la capacidad de mantener un calidad organoléptica, nutricional y funcional en los alimentos y bebidas tratados (Sánchez-Moreno et al., 2018).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono y reozonización sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica (pH, SST y acidez titulable), producción de etanol (% v/v) y calidad

nutracéutica (actividad antioxidante y compuestos fenólicos) en aguamiel de *A. salmiana*.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Material vegetal

Se utilizaron muestras de 1 L de aguamiel de *A. salmiana* cultivar Ayoteco recolectadas en Coatepec, Estado de México. Durante el mes de mayo del 2021, el aguamiel se recolectó matutinemente de plantas en producción intermedia durante 5 días. El aguamiel se colocó en botellas de vidrio, previamente esterilizadas. Se conservó y trasladó a una temperatura de aproximadamente 2 °C con el uso de hielo seco durante aproximadamente 1 h hasta su análisis.

6.4. Planeación experimental

Se utilizó un modelo mixto bajo un diseño de bloques completos aleatorios y una prueba de Tukey–Kramer ($\alpha=0.05$). La unidad experimental se constituyó de 100 mL de aguamiel colocados en probetas de vidrio. Se aplicaron 6 y 12 min de ozono) más un control (0 min). Posteriormente, se evaluó el efecto de la aplicación de ozono sobre la población total de microorganismos (PTM), SST, pH, acidez titulable, producción de etanol (% v/v), compuestos fenólicos solubles totales y actividad antioxidante a las 0, 12, 24 y 48 h de tiempo de almacenamiento. Posteriormente, se realizó una reinyección de ozono en aguamiel ozonizado con 48 h de tiempo de almacenamiento (reozonización). Así mismo, a través del tiempo de almacenamiento, se realizó un registro de temperatura del ambiente con un sensor Hobo®, cada hora.

El modelo estadístico se expresa (Littell et al., 2006):

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \alpha_k + (\tau\alpha)_{jk} + \delta_{jk} + \epsilon_{jk}$$

$i = 1, 2, \dots, r.$
 $j = 1, 2, \dots, p.$
 $k = 1, 2, \dots, t.$

Donde y_{ijk} es la respuesta en el i -ésimo bloque con el j -ésimo tratamiento en el k -ésimo tiempo, μ es la media general, τ_j es el efecto del j -ésimo tratamiento, β_i es el efecto del i -ésimo bloque, α_k es el efecto aleatorio del k -ésimo tiempo,

$(\tau\alpha)_{it}$ es el efecto de la interacción del j-ésimo tratamiento y el k-ésimo tiempo, ϵ_{ijk} es el error aleatorio asociado al i-ésimo bloque con el j-ésimo tratamiento en el k-ésimo tiempo y δ_{jk} es el error aleatorio del factor tiempo. Modelo bajo los supuestos $\epsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma_\epsilon^2)$ y $\delta_{jk} \sim NI(0, \sigma_\delta^2)$ con σ^2 homogénea.

6.4.1. Aplicación de ozono

La ozonización del aguamiel se efectuó con un equipo (Biozon, PTA mini, México) con una producción de ozono de 1.2 g h⁻¹. El aguamiel fue colocado en probetas de vidrio de 300 mL, la inyección de ozono se realizó a través de una manguera de polipropileno con orificios la cual se introdujo a través de la probeta de vidrio para lograr un mayor contacto del ozono con la muestra.

6.4.2. Recuento de la población total de microorganismos en aguamiel.

a) Recuento de la población total de microorganismos

El recuento total de la población de microorganismos se realizó a través del uso de la cámara Neubauer (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Se tomó 1 mL de cristal violeta y se diluyó en 9 mL de agua esterilizada (Gómez & Martínez, 2021). Seguido, se tomó 0.5 mL de muestra y se le añadió 0.5 mL de cristal violeta, previamente diluido. Con el uso de microscopio óptico y el objetivo a 100x, se contó el número total de microorganismos de cinco cuadrantes y se calculó el promedio. Posteriormente, se utilizó la siguiente fórmula (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

$$PTM = (\bar{Y})(FD)(2)(10,000)$$

Donde:

- PTM es la población total de microorganismos
- \bar{Y} es el promedio de cinco cuadrantes
- FD es el factor de dilución de la muestra
- 2 corresponde al factor de dilución de la tinción

b) Recuento de células viables

Se llevó a cabo el recuento de levaduras según lo reportado con la AOAC 997.02 (1988), a través del uso de Placas YM 3M Petrifilm® y un recuento de Bacterias Ácido-Lácticas en agar MRS.

6.4.3. Variables fisicoquímicas

Acidez titulable. Se determinó por el método descrito en el manual AOAC 939.05 (2000), que se basa en la titulación de 10 mL de muestra de aguamiel con una solución valorada de NaOH 0.1 N, y fenolftaleína como indicador. Se reportó como porcentaje de ácido láctico.

Determinación de etanol por CG. Este compuesto volátil se cuantificó mediante cromatografía de gases siguiendo la técnica de espacio de cabeza (head space) propuesta por Davis y Chase (1969). Se colocó una muestra de 5 mL de aguamiel en un vial de vidrio de 26 mL y se selló. Seguido, se tomó una alícuota gaseosa de 1 mL del espacio superior con una jeringa y se inyectó en una columna GC (Varian Star 3400, EE. UU.) SS empaquetada con Poropak N, 2 mx 3 mm externo y diámetro interno de 2 mm, equipado con TCD detector de conductividad térmica) y FID (detector de ionización de llama). Se utilizó He como gas portador. Posteriormente, se inyectó un estándar de etanol de concentración conocida para construir la curva estándar. Los resultados se expresaron en % de etanol (v/v).

pH. Se midió con un potenciómetro (H1 2221 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) según lo descrito por la 981.12-AOAC (2019).

Sólidos solubles totales. Se determinó con la ayuda de un refractómetro digital portátil PAL-1 según lo indicado en 932.12-AOAC (2010).

6.4.4. Variables nutracéuticas

Preparación del extracto. Se tomaron 1.5 mL de aguamiel y se aforo a 5 mL con metanol acuoso al 80 % (v/v), seguido se dejó el extracto en refrigeración durante 24 h. Se decantó el extracto en matraces de 5 mL y se aforó con metanol acuoso al 80 % (v/v). Después, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos

a 4000 rpm, esto con fin de poder separar los sólidos no solubles que pudieran interferir en los análisis nutracéuticos.

Cuantificación de compuestos fenólicos solubles totales. El contenido de CF solubles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965). Una alícuota de 0.2 mL del extracto fenólico (aguamiel) se mezcló con 2 mL de agua y 0.2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N, Sigma - Aldrich), se dejó reposar durante 3 min. Posteriormente, a la mezcla se le adicionaron 0.8 mL de Na_2CO_3 (7.5 % p/v) y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente, durante 1 h. Finalmente, se tomó lectura de la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s, Thermo Scientific, USA). Para cuantificar la concentración de fenoles, se realizó una curva estándar preparada a base de ácido gálico, se realizaron los cálculos pertinentes y se expresó el resultado en mg equivalentes de ácido gálico por 100 mL de aguamiel ($\text{mg EAG } 100 \text{ mL}^{-1}$).

Actividad antioxidante

Método ABTS. La medición de la AA por medio de la captación del radical ABTS se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Miller y Rice-Evans (1996) con algunas modificaciones. Se preparó una solución 7 mM de ABTS en agua destilada y otra solución de 2.45 mM de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, las cuales se combinaron en una relación 1:1. La mezcla se dejó reposar en oscuridad por 16 h. Posteriormente, se diluyó con etanol anhidro hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.01 a una longitud de onda de 734 nm. Se tomó lectura en el espectrofotómetro de un blanco (metanol acuoso al 80 % v/v), seguido, se preparó una solución con 2000 μL de ABTS más 20 μL de metanol acuoso al 80 % (v/v) y se realizó la lectura en el espectrofotómetro. Por otra parte, se preparó una solución con 2000 μL de ABTS más 20 μL del extracto de la muestra y se dejó en almacenamiento durante 30 minutos en oscuridad, se realizó la lectura en el espectrofotómetro. La AA se cuantificó a través de una curva estándar de

trolox. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por cada 100 mL de aguamiel en peso fresco ($\mu\text{M TE } 100 \text{ mL}^{-1}$).

Método FRAP. La medición de la AA por medio del poder antioxidante reductor férrico (FRAP), se realizó según el método de Benzie y Strain (1999). El reactivo FRAP se preparó con 0.3 M de buffer de acetato con un pH= 3.6, una solución de 10 mM de férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) en HCl 40 mM y 20 mM de FeCl_3 , para obtener el FRAP, en un frasco ámbar se mezcló el buffer, cloruro férrico y TPTZ en una relación 10:1:1. Se tomó 3 mL de FRAP a 37° C y se mezcló con 0.1 mL de extracto y 0.3 ml de agua destilada. Seguido se colocó en baño de agua a 37 °C por 30 minutos. Se midió la absorbancia de la mezcla del FRAP con el extracto a 593 nm a través del espectrofotómetro. Para cada análisis se tuvo en cuenta la lectura de FRAP sin extracto. La AA se cuantificó a través de una curva estándar de trolox. Los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por cada 100 mL de aguamiel en peso fresco ($\mu\text{M TE } 100 \text{ mL}^{-1}$).

6.5. Resultados y discusión

a) Ozonización

Población total de microorganismos. La Figura 9 muestra que, a lo largo de 48 h de almacenamiento, la población total de microorganismos en el testigo fue estadísticamente superior ($p \leq 0.05$) al encontrado en aguamiel con diferentes niveles de tiempo de ozono. De esta manera, se obtuvieron dos grupos diferentes ($p \leq 0.05$) de aguamiel, el aguamiel testigo y aguamiel con ozono (6 y 12 min). Entre las 12 y 24 h no se evidenció un incremento de microorganismos en aguamiel, teniendo en promedio un valor de 6.56 y 6.38 $\log_{10} \text{ mL}^{-1}$ en el testigo y con la aplicación de ozono, respectivamente. A partir de a las 48 h de tiempo de almacenamiento se observó un incremento significativo de 0.038 y 0.141 $\log_{10} \text{ mL}^{-1}$ en cada grupo de aguamiel.

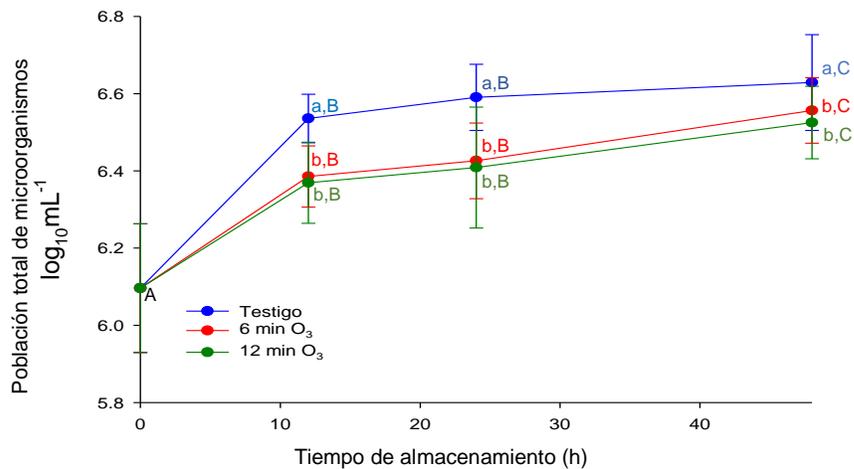


Figura 9. Cambios de la población total de microorganismos ($\log_{10} \text{mL}^{-1}$) en aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo de ozonizado a lo largo de 48 h de almacenamiento. Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Células viables. No se observó efecto significativo ($p \leq 0.05$) de los tratamientos a lo largo de 48 h de almacenamiento sobre el conteo de levaduras totales (LT), bacterias ácido-lácticas (BAL) y la población total de microorganismos (PTM). Sin embargo, el factor tiempo de almacenamiento incrementó significativamente el conteo de BAL y la PTM de 5.135 a 5.922 UFC $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$ y 7.258 a 7.446 $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Cuadro 9). Es importante reportar que la temperatura fue un factor significativo que influyó en el crecimiento de los microorganismos durante las primeras 48 h, dado que las muestras se encontraban a 25.44 ± 1.18 °C. Velázquez-López et al. (2018) informaron el crecimiento de cepas de BAL en pozol tradicional chiapaneco en un rango de temperatura de 28 a 37 °C. Asimismo, Paula et al. (2018) indicaron que el crecimiento de BAL está fuertemente influenciado por la temperatura de almacenamiento. En el caso de las levaduras, Lin et al. (2012) reportaron el crecimiento de estas en un rango de 10 a 50 °C donde la tasa máxima de

crecimiento fue en un rango de 30 a 45 °C, no obstante, otros autores reportan que entre 20 a 35 ° C es el rango ideal.

Cuadro 9. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: Bacterias ácido-lácticas (BAL) y Levaduras totales (LT) en aguamiel tratado con diferentes niveles de tiempo exposición de ozono.

	Tiempo de almacenamiento (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)	
		0	12
BAL	24	5.26 ± 0.16 a,A	5.01 ± 0.25 a,A
(UFC Log ₁₀ mL ⁻¹)	48	5.98 ± 0.06 a,B	5.86 ± 0.33 a,B
LT	24	5.85 ± 0.16 a,A	5.70 ± 0.07 a,A
(UFC Log ₁₀ mL ⁻¹)	48	6.68 ± 0.06 a,A	6.28 ± 0.46 a,A
PTM	24	7.27 ± 0.01 a,A	7.25 ± 0.23 a,A
(Log ₁₀ mL ⁻¹)	48	7.45 ± 0.03 a,B	7.34 ± 0.15 a,B

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Acidez titulable. El efecto de ozono sobre la producción de ácido láctico en aguamiel fue consistente entre los tratamientos (Figura 10), por lo tanto, para esta variable no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes niveles de aplicación de ozono.

Sin embargo, el factor tiempo de almacenamiento mostró efecto ($p \leq 0.05$) sobre la producción de ácido láctico. Por consiguiente, a lo largo de 48 h el valor de la acidez aumentó de 0.062 a 1.044 g de ácido láctico L⁻¹ de aguamiel en promedio.

Esta producción de ácido láctico se puede atribuir al grupo de bacterias encontradas, en su mayoría BAL. Así, Trevanich et al., (2016) indican que las BAL provocan una rápida acidificación de las materias primas mediante la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácidos lácticos. Por su parte, Escalante et al. (2016) mencionan que en aguamiel a lo largo del tiempo (durante la fermentación del pulque) se desarrollan algunos productos metabólicos distintivos, entre ellos, el ácido láctico que es producido por *Lactobacillus* sp. y *Leuconostoc* sp. que conducen la fermentación ácida.

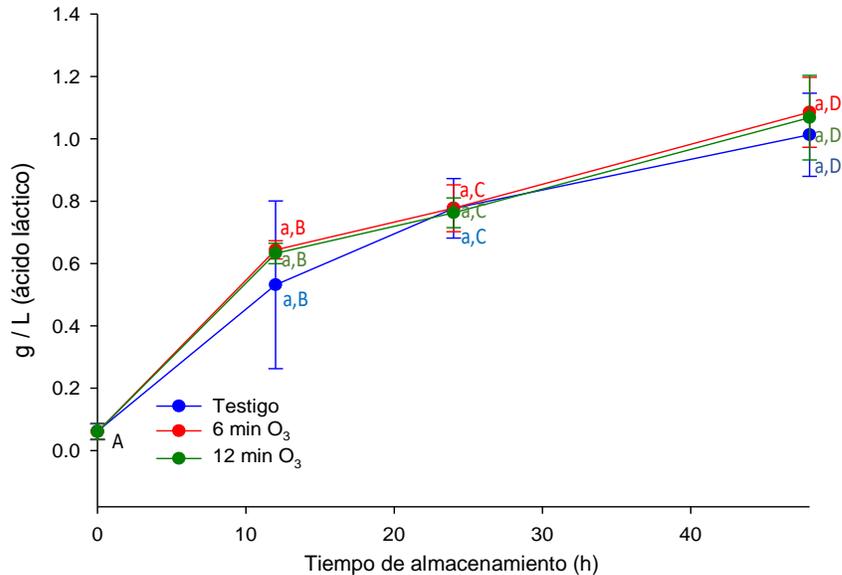


Figura 10. Producción de g /L de ácido láctico en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono. Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Sólidos solubles totales (SST). Los sólidos solubles totales (SST) facilitan información sobre el contenido de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos inorgánicos y sus variaciones durante el almacenamiento (Panou et al., 2021). En la Figura 11 se visualiza que la concentración de SST en aguamiel disminuyó con el tiempo, no se evidenció diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos a lo largo de 48 h, es decir, se observó un comportamiento similar en todos los tratamientos.

Durante las 12 y 24 h no se observó cambios significativos ($p \leq 0.05$) sobre el contenido de SST en aguamiel, obteniendo en promedio una concentración de 12.56 °Bx. Por otro lado, a las 48 h existió una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de 2.01 °Bx en promedio. Se ha reportado que el ozono puede llegar a reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas y ocasionar una autodegradación del mismo hasta oxígeno, y de esta manera interferir sobre la inactivación microbiana (Gil-Muñoz et al., 2005). Así, al no tener efecto el ozono sobre los SST, dicho comportamiento se puede atribuir a la fermentación, de acuerdo con Luis et al.

(2019) durante la fermentación existe una transformación de azúcares en etanol. Por su parte, Valadez-Blanco et al. (2012) afirman que la concentración de carbohidratos en aguamiel disminuye con el tiempo después de la apertura de la planta, lo cual puede deberse a la fermentación. Además, como en el caso del crecimiento de la población de microorganismos, la temperatura fue un factor significativo que influyó sobre la reducción de los SST durante las primeras 48 h.

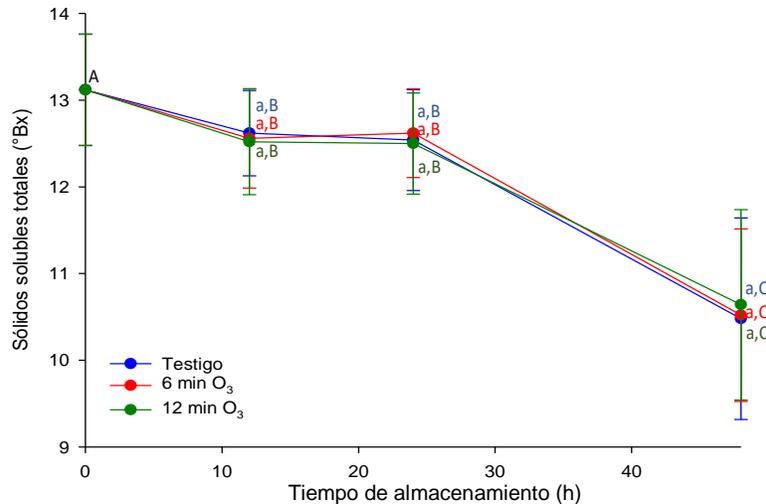


Figura 11. Concentración de sólidos solubles totales (°Bx) en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel de *A. salmiana*. Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

pH. En el caso del valor de pH, al igual que el resto de las variables fisicoquímicas. En general el pH en aguamiel se mantuvo estable, sin efectos significativos ($p \leq 0.05$) en los diferentes tratamientos aplicados. Sin embargo, hubo un efecto significativo ($p \leq 0.05$) del tiempo sobre el valor de pH en aguamiel (Figura 12), demostrando una disminución significativa ($p \leq 0.05$) durante las primeras 12 h (6.356 a 2.994, Figura 12).

Así, Ortiz-Basurto et al. (2008) indicaron que los valores de pH se mantienen alrededor de 4.5 a lo largo del tiempo, en todas las muestras de aguamiel de *A. mapisaga*. Además, cabe destacar que algunos autores tal como Velázquez-López et al., (2018) indican que las BAL resisten a los cambios de pH,

demonstraron que cepas aisladas de BAL en muestras de pozol blanco y pozol con cacao, almacenadas a temperatura ambiente, resistieron cambios de pH durante 24 h, mostrando mayor crecimiento a valores cercanos a 4.0.

Este efecto no significativo sobre los parámetros fisicoquímicos puede deberse a la inestabilidad del ozono, como indican García-Chamizo et al., (2020) la estabilidad del ozono depende de diversos factores, tal como: la temperatura, humedad, la interacción con otras sustancias entre otros factores, además, en medios líquidos y sobre todo a pH elevados el ozono es rápidamente eliminable debido a su auto descomposición.

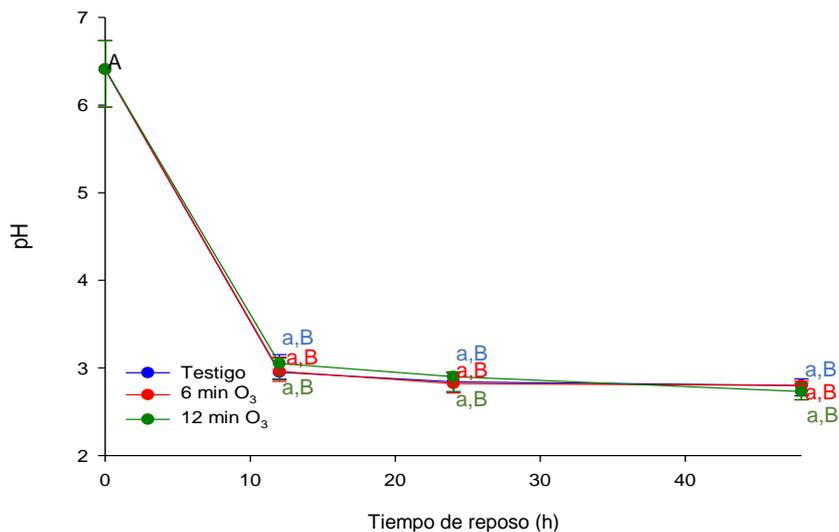


Figura 12. Valores de pH en aguamiel tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel de *A. salmiana*. Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Cuantificación de etanol. En la Figura 13 se observa el efecto significativo ($p \leq 0.05$) del factor tiempo de almacenamiento sobre la producción de etanol en aguamiel. Al no existir una eliminación completa de la población total de microorganismos en aguamiel, la producción de etanol se pudo deber a la presencia de ciertos microorganismos; tal como *Saccharomyces* sp,

Lactobacillus sp y *Zymomonas* sp los cuales son responsables de la producción de etanol (Cervantes Contreras & Pedroza, 2007). De esta manera, se produjo una baja concentración de etanol en aguamiel durante las primeras 24 h, con una producción de 0.134 a 0.441 % de etanol (v/v). A partir de las 48 h se evidenció un incremento en cada uno de los tratamientos, siendo el testigo el de mayor concentración con una producción de 3.181 % de etanol (v/v).

El efecto del ozono a lo largo de 48 h de almacenamiento no fue significativo. Cervantes Contreras & Pedroza (2007) reportaron que el producto obtenido en aguamiel tras 48 h de fermentación a temperatura ambiente se caracterizó por tener 10.35 % (v/v) de etanol.

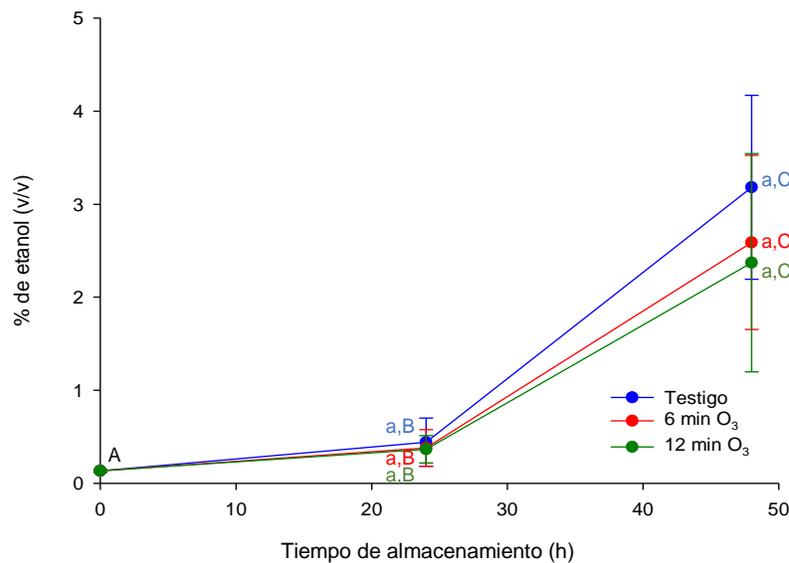


Figura 13. Producción de % de etanol (v/v) tratada con diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono en aguamiel de *A. salmiana* Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Compuestos fenólicos solubles totales. En la Figura 14 se observa que no existió diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes niveles de tiempo de aplicación de ozono. Sin embargo, a mayor tiempo de almacenamiento existió una disminución del contenido de CF en aguamiel. De manera general, se observó una disminución del contenido de CF de 20.22 a 15.69 mg EAG 100 mL⁻¹ de aguamiel, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

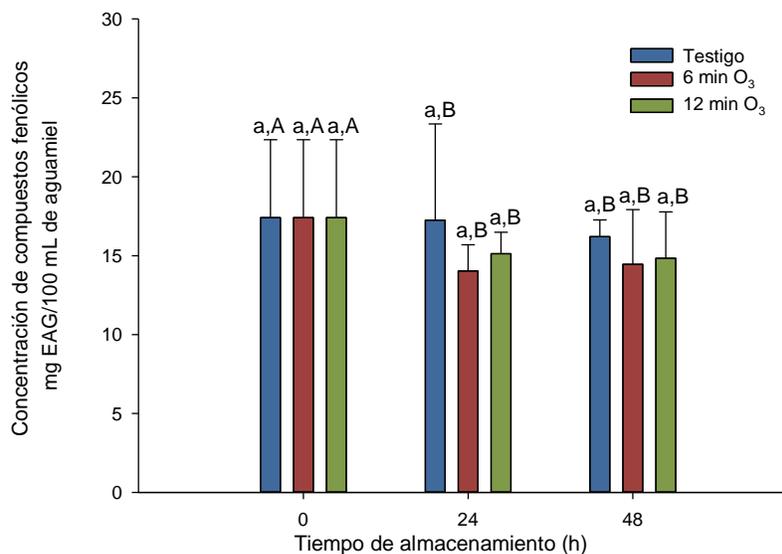


Figura 14. Concentración de compuestos fenólicos (mg EAG/100 mL de aguamiel) en aguamiel ozonizada. Letras distintas indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre tiempos, letras minúsculas diferencias entre tratamientos

Shah et al. (2019) indicaron que los compuestos fenólicos son particularmente susceptibles al ataque del ozono dado que la autodescomposición del oxígeno triatómico se acompaña de la producción de numerosas ROS. Las ROS, a su vez, pueden ser eliminadas por los CF, lo que podría reducir el contenido de estos después de la exposición al ozono. Por su parte, Aparecida et al., (2017) mencionan que el ozono puede dividir el anillo de benceno de los grupos fenólicos y los CF pueden sufrir oxidación a través del mecanismo de Criegee.

Actividad antioxidante. Al igual que los compuestos fenólicos, se observó una disminución en los valores de la AA en aguamiel a través del tiempo de almacenamiento. Fundo et al. (2021) mencionan que la presencia de compuestos fenólicos, es uno de los principales factores que influyen en la capacidad antioxidante de las frutas.

Una vez aplicados los diferentes tiempos de ozono en aguamiel, en el método ABTS se evidenció un efecto significativo del ozono ($p \leq 0.05$). A lo largo de 24 h el mayor tiempo de exposición de ozono (12 min) ocasionó una mayor reducción de AA ($121.424 \mu\text{M ET } 100 \text{ mL}^{-1}$ de aguamiel, Figura 15a). Al terminó de las 48 h, la AA descendió en todas las unidades experimentales sin mostrar diferencias entre los tratamientos, obteniendo un promedio general de $220.296 \mu\text{M ET } 100 \text{ mL}^{-1}$ de aguamiel. Miller et al. (2013) mencionan que se espera que el ozono provoque la pérdida de compuestos antioxidantes debido a su fuerte actividad oxidante en frutas y vegetales, esto debido a la acción de una reacción directa entre el ozono y un antioxidante que desencadena un proceso de desintoxicación del ozono resultado de la formación de diferentes ROS, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (OH) dentro de la célula vegetal (Moldau, 1998).

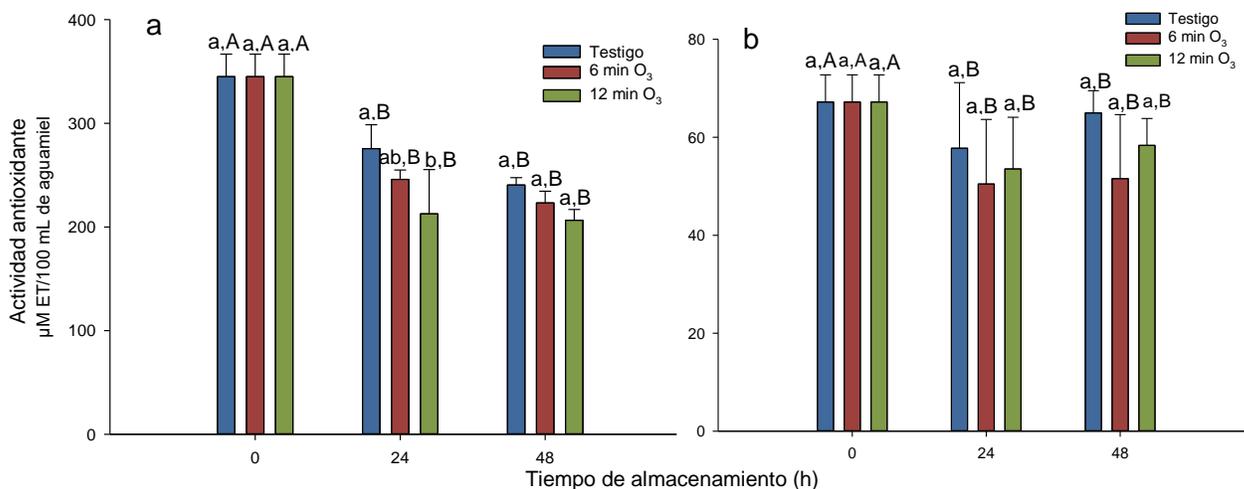


Figura 15. Cambios en la actividad antioxidante ($\mu\text{M ET } / 100 \text{ mL}$ de aguamiel) en aguamiel de *A. salmiana* ozonizada. Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey-Kramer con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre tiempos, letras minúsculas diferencias entre tratamientos. (a) ABTS y (b) FRAP.

En el método FRAP no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del ozono sobre la AA en aguamiel a lo largo de 48 h. Sin embargo, hubo un efecto significativo del tiempo ($p \leq 0.05$) sobre la AA. De esta manera, durante las primeras 24 h de almacenamiento ocurrió una disminución significativa de la AA de 72.64 a 56.66 $\mu\text{M ET } 100\text{mL}^{-1}$ (Figura 15b), mientras que entre las 24 y 48 h se mantuvo estable con un valor promedio de 56.97 $\mu\text{M ET } 100\text{mL}^{-1}$.

Como afirman Khadre et al. (2001) el ozono se descompone continuamente, en soluciones acuosas es altamente inestable. Además, la literatura describe que la disminución del contenido de compuestos fenólicos se debe principalmente al potencial oxidante del ozono (Sachadyn-Król & Agriopoulou, 2020).

Por su parte, Sachadyn-Król & Agriopoulou (2020) reportan que el ozono funciona como un inductor de diversos compuestos entre ellos los compuestos fenólicos, seguido el ozono se puede eliminar fácilmente en cualquier momento después de la aplicación.

b) Reozonización

A las 48 h de tiempo de almacenamiento se reinyectó ozono a las unidades experimentales de los tratamientos, excluyendo aquellas del testigo.

Población total de microorganismos. La reozonización no mostró efecto significativo ($p \leq 0.05$) sobre la población total de microorganismos, por consiguiente, a las 72 h se evidenció un incremento medio de 2.184 $\log_{10} \text{ mL}^{-1}$ en cada uno de los tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cambios en la población total de microorganismos (PTM) en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)		
		0	6	12
PTM	48	6.63 ± 0.14 a,A	6.66 ± 0.10 a,A	6.52 ± 0.13 a,A
($\log_{10} \text{ mL}^{-1}$)	72	6.68 ± 0.08 a,B	6.62 ± 0.06 a,B	6.59 ± 0.05 a,B

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

En las **células viables** la aplicación de una reozonización y el tiempo de almacenamiento no causaron efecto significativo ($p \leq 0.05$) sobre los microorganismos, de acuerdo con esto, al término de las 72 h se obtuvieron 7.078 UFC $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$ de LT, 6.538 UFC $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$ de BAL y 7429 $\text{Log}_{10} \text{mL}^{-1}$ de PTM (Cuadro 11). Esto se pudo deber a que el ozono como indica Martins Pinheiro et al. (2019) en pH ácido es menos eficiente para la oxidación, mientras que en medio alcalino este gas reacciona a través de radical hidroxilo y por lo general es más eficiente en la oxidación.

Cuadro 11. Población total de microorganismos (PTM) y células viables: bacterias ácido-lácticas (BAL), levaduras totales (LT) presentes en aguamiel reozonizado.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)	
		0	12
BAL	24	5.260 ± 0.163 a,A	5.010 ± 0.251 a,A
(UFC $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$)	48	5.984 ± 0.057 a,B	5.859 ± 0.334 a,B
LT	24	5.850 ± 0.163 a,A	5.698 ± 0.068 a,A
(UFC $\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$)	48	6.684 ± 0.057 a,A	6.277 ± 0.460 a,A
PTM	24	7.267 ± 0.004 a,A	7.250 ± 0.233 a,A
($\text{Log}_{10}\text{mL}^{-1}$)	48	7.446 ± 0.026 a,B	7.343 ± 0.147 a,B

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Acidez titulable, SST y pH. Los análisis entre las 48 y 72 h no evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. No obstante, se observó un aumento significativo de 1.044 a 1.218 g de ácido láctico L^{-1} de aguamiel, una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de 10.547 a 8.260 de SST y una disminución de pH de 2.751 a 2.671 (Cuadro 12).

Cuadro 12. Cambios en los valores de pH, contenido de SST y producción de acidez en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)		
		0	3	6
pH	48	2.79 ± 0.10 a,A	2.75 ± 0.11 a,A	2.732 ± 0.09 a,A
	72	2.64 ± 0.07 a,B	2.68 ± 0.08 a,B	2.692 ± 0.08 a,B
Sólidos solubles totales (°Bx)	48	10.48 ± 1.16 a,A	10.52 ± 1.00 a,A	10.64 ± 1.10 a,A
	72	8.06 ± 0.50 a,B	8.12 ± 0.62 a,B	8.6 ± 1.30 a,B
Acidez (g L ⁻¹ ácido láctico)	48	1.01 ± 0.13 a,A	1.08 ± 0.11 a,A	1.07 ± 0.13 a,A
	72	1.22 ± 0.14 a,B	1.20 ± 0.13 a,B	1.23 ± 0.21 a,B

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de

Cuantificación de etanol. La producción de etanol no resultó afectada por la reozonización, pero fue favorecida por el tiempo de almacenamiento debido a que se observó un incremento significativo ($p \leq 0.05$) de producción de etanol (1.033 a 1.488 % etanol (v/v), Cuadro 13) de las 48 a las 72 h.

Cuadro 13. Porcentaje de producción de etanol obtenido en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)		
		0	6	12
etanol (% v/v)	48	3.18 ± 0.99 a,A	2.59 ± 0.94 a,A	2.37 ± 1.17 a,A
	72	5.95 ± 1.35 a,B	4.75 ± 1.55 a,B	4.75 ± 1.57 a,B

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Shmit et al. (2014) reportaron que una característica química importante del pulque, es que presenta un contenido de etanol del 4-9 % (v/v), por tal motivo, se puede decir que el aguamiel entre las 48 y 72 h de tiempo de almacenamiento, presentó indicios de una fermentación. Los principales microorganismos encontrados en el pulque son los géneros *Lactobacilos* responsables de incrementar la acidez láctica del pulque y *Leuconostoc* generadores de la viscosidad de la bebida así como cepas de *Saccharomyces carbajail* sp., el cual

es un fermentador alcohólico; y *Pseudomonas lindneri*, productoras de etanol (González et al., 2016). Así mismo, es importante reportar que la temperatura de almacenamiento influyó significativamente ($p \leq 0.05$) sobre la producción del % de etanol (v/v) en aguamiel.

Actividad antioxidante. En ambos métodos (ABTS y FRAP) hubo efecto significativo ($p \leq 0.05$) de la reozonización. Durante las 48 y 72 h de almacenamiento, mediante el método de FRAP la aplicación de 6 y 12 min de ozono evidenció una mayor disminución de AA de 12.11 y 17.45 $\mu\text{M ET } 100\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Cuadro 14). En contraste, el método ABTS registró una mayor reducción de AA con la aplicación de 12 min de ozono (45.38 $\mu\text{M ET } 100\text{mL}^{-1}$) de AA.

Compuestos fenólicos solubles totales. Con relación a la reozonización no hubo efectos significativos ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, evidenciando así una disminución de 15.22 a 13.45 mg EAG 100 mL^{-1} de aguamiel (Cuadro 14) a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Cuadro 14. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos solubles totales (CF) y actividad antioxidante (ABTS y FRAP) en aguamiel reozonizado, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

	Tiempo (h)	Tiempo de exposición de ozono (min)		
		0	6	12
ABTS	48	239.81 \pm 7.82 Aa	216.71 \pm 17.88 Aab	204.37 \pm 12.61 Ab
	72	242.26 \pm 29.38 Ba	185.88 \pm 22.37 Bab	158.99 \pm 30.65 Bb
FRAP	48	61.94 \pm 7.56 Aa	54.42 \pm 10.21 Ab	55.49 \pm 8.36 Ab
	72	58.17 \pm 12.26 Ba	42.31 \pm 5.43 Bb	38.03 \pm 9.50 Bb
CF	48	15.99 \pm 1.28 Aa	14.89 \pm 3.03 Aa	14.77 \pm 3.00 Aa
	72	15.22 \pm 0.96 Ba	12.98 \pm 2.63 Ba	12.17 \pm 3.00 Ba

Letras distintas indican diferencias de acuerdo al test Tukey - Kramer con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Letras mayúsculas indican el análisis estadístico entre mediciones a través del tiempo (h), letras minúsculas diferencias entre tratamientos (tiempo de exposición de ozono en min).

Un factor que probablemente influyó sobre la disminución de los CF en aguamiel fue el proceso de fermentación, como indican García-Martínez et al. (2021) la pérdida de CF en el mosto del vino se debió a la adsorción de estos compuestos a las paredes celulares de las levaduras, que son las responsables de la producción de una fermentación alcohólica. Por otro lado, Bustamante & Tenorio (2013) encontraron que los niveles de procianidinas (CF) disminuyen de 3 a 5 veces durante la fermentación de diferentes clones de cacao colombiano.

6.6. Conclusión

Ozonización

- El aguamiel tratado con 6 y 12 min de ozono mantuvo una baja población total de microorganismos con respecto al testigo, a lo largo de 48 h de tiempo de almacenamiento.
- En el caso de los parámetros fisicoquímicos pH, SST y acidez (g de ácido láctico L⁻¹ de aguamiel) no se afectaron por la aplicación de diferentes niveles de tiempo de ozono. Sin embargo, el factor tiempo de almacenamiento influyó en cada una de las variables fisicoquímicas.
- La producción de etanol (% v/v) en aguamiel no se afectó con los diferentes niveles de tiempos de aplicación de ozono, sin embargo, a mayor tiempo de almacenamiento hubo un aumento de etanol (% v/v) en aguamiel.
- El contenido de compuestos fenólicos solubles totales (CF) no se afectó significativamente ($p \leq 0.05$) por la aplicación de diferentes tiempos de ozono, pero a mayor tiempo de almacenamiento menor concentración de CF.
- Se obtuvo una mayor reducción de la actividad antioxidante en aguamiel, mediante la aplicación de 12 min de ozono.

Reozonización

- El efecto de la reozonización no fue significativo sobre la población total de microorganismos (PTM) durante las 48 y 72 h de almacenamiento, no obstante, a mayor tiempo de almacenamiento mayor número de PTM.
- La reozonización no afectó significativamente ($p \leq 0.05$) los parámetros fisicoquímicos y la concentración de etanol (% v/v) en aguamiel.
- A mayor tiempo de almacenamiento se evidenció una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la concentración de CF en aguamiel.
- Tanto la reozonización como el tiempo de almacenamiento fueron significativos ($p \leq 0.05$) sobre la actividad antioxidante del aguamiel.

6.7. Literatura citada

- Aparecida, J., Sartori, D. S., Fernando, C., Angolini, F., Eberlin, M. N., & Aguiar, C. L. De. (2017). Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.028>
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, January, 10. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- AOAC. (2019). Association of official analytical chemists. Official method 981.12. Determination of ph. official methods of the aoac international, 21th ed. maryland/usa: AOAC International.
- AOAC. (2010). Association of official analytical chemists. Official Method 932.12. Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products. In A. International, Official Method of Analysis. Gaithersburgs: AOAC International
- AOAC. (1998). Yeast and Molds Counts in Foods. Dry Rehydratable Film Method. Petrifilm Method; Official Method 997.02; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
- AOAC. (2000). Official methods of Analysis.16 th Edition. Association of official Analytical Chemists. Washington D.C; USA.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
- Boatella, J., Estelrich, J., Codony, R., Guardiola, F., & Rafecas, M. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos ii* (Publicacio, Issue 1).
- Bustamante, S. Z., & Tenorio, A. T. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano Effect of fermentation on the antioxidant activity of different Colombian cocoa clones. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(3), 391–404.
- Castro-Díaz, A. S., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2021). Efecto de luz ultravioleta-C y ultrafiltración sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales de savia de Agave *salmiana* almacenada. *Información Tecnológica*, 32(4), 65–76. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642021000400065>

- Cervantes Contreras, M., & Pedroza Rodríguez, A. M. (2007). El Pulque: Características Microbiológicas y Contenido Alcohólico Mediante Espectroscopia Raman. *Nova*, 5(8), 135. <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- Collado-Montero, F. J., Melgosa, M., Fernández, E., & Medina, V. J. (2015). Colorimetric study of the tiles in Patio de las Doncellas of the Real Alcázar of Seville (Spain). *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 54(3), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2015.03.002>
- Chagua-Rodríguez, P., Malpartida-Yapias, R. J., & Ruíz-Rodríguez, A. (2020). Tiempo de pasteurización y su respuesta en las características químicas y de capacidad antioxidante de aguamiel de *Agave americana* L. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 45–57. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.532>
- Davis, P.L.; Chase, W.G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of head space. *HortScience* 4: 117-119.
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Fundo, J. F., Garcia, E., Silva, C. L. M., & Brand, T. R. S. (2021). Effect of Gaseous Ozone Process on Cantaloupe Melon Peel : Assessment of Quality and Antilisterial Indicators. *Assessment of Quality and Antilisterial Indicators. Foods*, 10(4), 727.
- García-Martínez, T., Angeles, M., Martín-G, J., Julieta, M., & Serratos, M. P. (2021). Phenolic compounds , antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts. *LWT - Food Science and Technology*, 146(April). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111661>
- García-Chamizo, J. M., Alcañiz Lucas, S., Ferrandez-Pastor, F. J., Pérez Maciá, J. J., Silveira Madrid, D., & García Pérez, M. (2020). Revisión de las Aplicaciones del Ozono y su Generación para el Uso en Mascarillas contra Patógenos. Versión Preliminar.
- Gil-Muñoz, M., Allende, A., Beltrán Riquelme, D., & Selma, M. V. (2005). Nuevas tendencias de procesado y conservación de alimentos vegetales de IV gama obtenido de
- González, M. F., Vázquez, C. P., Jaimez, O. A., & Zúñiga, J. M. (2016). Potencial probiótico de bacterias aisladas del pulque: una revisión. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 924–930.

- Gómez, C. A. & Martínez, R.S. (2021). Técnica de tinción implementada en el laboratorio de microbiología de alimentos. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.
- Inocente-Quiroz, F. E., Eccoña-Sota, A., & Silva-Paz, R. J. (2021). Alimentos mínimamente procesados: Generalidades, procesamiento, consumo y cambios físicos, químicos y biológicos. *Agroindustrial Science*, 11(1), 117-126.
- Kader, A. A. (2002). *Postharvest Technology of Horticultural Crops* - Adel A. Kader - Google Libros. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=O1zhx2OWftQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Kader,+A.A.+2002.+Post-harvest+technology+of+horticultural+crops.+Oakland:+University+of+California,+Division+of+Agriculture+and+Natural+Resources.+Publication+3311,+pp.+39-48.&ots=4iv090wiKP&sig=sQPrFR8wEXU_vG49nmftYy2FEjg#v=onepage&q&f=false
- Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2001). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., & Schabenberger, O. (2006). SAS for mixed models. SAS Institute. *Inc., Cary, NC, 814*.
- Martins Pinheiro, A., Salla, M. R., & Bolanos Rojas, M. L. (2019). Tratamiento de aguas residuales provenientes de industria de productos de limpieza y desinfectantes por ozonización convencional y catalítica. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 27(2), 223–235. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052019000200223>
- Miller, F. A., Silva, C. L. M., & Brandão, T. R. S. (2013). A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2(3), 161–171. <https://doi.org/10.1080/13510002.1996.11747044>
- Moldau, H. (1998). Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 617–622.
- O'Donnell, C., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & Rice, R. G. (2012). *Ozone in*

food processing. John Wiley & Sons.

- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Domier, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey pulquero (*Agave mapisaga*) through out the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 56, 3682–3687. <https://doi.org/http://dx.doi.org/0.1021/jf072767h>
- Paula, A., Longhi, D. A., Dalcanton, F., & Maria, G. (2018). *Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures*. 61, 1–11.
- Rodríguez, L. B. D., & de Hernández, R. M. A. (2021). Tecnologías postcosecha para promover la vida de anaquel de frutos pequeños. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 22(1), 29–49.
- Sachadyn-Król, M., & Agriopoulou, S. (2020). Ozonation as a method of abiotic elicitation improving the health-promoting properties of plant products-A review. *Molecules*, 25(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25102416>
- Sánchez-Moreno, C., González-Peña, D., Colina-Coca, C., & Ancos, B. D. (2018). Métodos físicos no tradicionales de control microbiológico aplicables al proceso de elaboración de hortalizas de IV Gama. *Agrociencia Uruguay*, 22(1), 26-36.
- Sánchez, B. F. (2017). *Tecnología para conservar el aguamiel - Mi Patente*. Revista Digital Sobre Patentes, Marcas y Propiedad Intelectual. <https://www.mipatente.com/tecnologia-para-conservar-el-aguamiel/>
- Shah, N. N. A. K., Sulaiman, A., Sidek, N. S. M., & Supian, N. A. M. (2019). Quality assessment of ozone-treated citrus fruit juices. *International Food Research Journal*, 26(5), 1405–1415.
- Sachadyn-Król, M., & Agriopoulou, S. (2020). Ozonation as a method of abiotic elicitation improving the health-promoting properties of plant products-A review. *Molecules*, 25(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/molecules25102416>
- Shmit, A. J., Castillo, F., Lazcano, D. K., Rojas, A., Núñez, Y., & Valdés, A. (2014). Bioetanol a partir del maguey (*Agave americana*) y su prospec- tiva en México. *Revista de ciencia e ingeniería del instituto tecnológico superior*, 75(1), 16–22.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology*, 16(3), 144–158. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.short>
- Trevanich, S., Sribuathong, S., & Bundidamorn, D. (2016). The Potential Health Benefits of Traditional Thai-Fermented Foods and Beverages. *Functional Properties of Traditional Foods, Integrating*

Food Science and Engineering Knowledge Into the Food Chain, 4(12), 189–198. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7662-8_4

Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

Velázquez-López, A., Covatzin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., & Vela-Gutiérrez, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco Fermented drink elaborated with lactic acid bacteria isolated from chiapaneco traditional pozol. *Biotecnología y ciencia agropecuarias*, 13(1), 165–178.

7. CONCLUSIONES GENERALES

El uso del método rápido (3M-PETRIFILM®) no fue adecuado para el conteo de los microorganismos encontrados en aguamiel. Debido a que sobreestimó el recuento de las BAL, CT y LT en aguamiel con respecto al método tradicional.

La aplicación de 12 min de ozono logró una mayor disminución de la población total de microorganismos a lo largo de 12 h. Por otro lado, el efecto del tiempo de almacenamiento disminuyó los valores de pH y SST en aguamiel.

La aplicación de los tratamientos de 6 y 12 min de ozono puede ser una alternativa para mantener una baja población total de microorganismos a lo largo de 48 h. No obstante, la aplicación de estos tratamientos no logró conservar las propiedades fisicoquímicas del aguamiel.

A mayor tiempo de almacenamiento existió una disminución del contenido de compuestos fenólicos solubles totales en aguamiel.

En el método ABTS, la aplicación de 12 min de ozono causó una mayor reducción de actividad antioxidante en aguamiel a lo largo de 48 h. Por otra parte, a través del método FRAP no se evidenció efecto de los diferentes tiempos de aplicación de ozono en aguamiel a lo largo del tiempo de almacenamiento.

La reozonización disminuyó la actividad antioxidante del aguamiel a lo largo del tiempo de almacenamiento.