



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

ESCUELA SUPERIOR DE APAN

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DEL FRÍO

TESIS

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE  
PULQUE ALMACENADO A BAJAS TEMPERATURAS.

Para obtener el título de  
Licenciada en Ingeniería en Tecnología del Frío

PRESENTA

Itzel Guadalupe Hernández Lozano

Directora

Dra. Adriana Cortázar Martínez

Codirectora

Dra. Alma Delia Román Gutiérrez

Comité tutorial

Dra. Gisela Ortiz Yescas

Mtra. Wendy Montserrat Delgadillo Ávila

Dra. Evelyn Corona López

Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo, diciembre 2023

## **Dedicatorias**

*A mis padres, Marisol Lozano y Amado Barrera por su apoyo y amor incondicional para poder salir adelante, gracias por confiar en mí y no soltarme de la mano. Este gran logro se los debo a ustedes. Los amo mucho.*

*A mis hermanos, Gabriela y Jesús, gracias por su apoyo en todo momento. Los amo.*

*Al amor de mi vida, Juan Saúl, las palabras nunca serán suficientes para agradecerte el apoyo para que este trabajo se llevara a cabo, sin ti esto no hubiera sido posible. Te amo*

*A Itsa por ser llegar justo a tiempo para ser parte de este proceso tan importante en mi vida.*

## **Agradecimientos**

*A la Dra. Adriana Cortázar Martínez por su asesoría, quien con su dirección se ha hecho posible la realización del presente trabajo.*

*Al comité tutorial integrado por la Dra. Gisela Ortiz Yescas, Mtra. Wendy Montserrat Delgadillo Ávila, Dra. Evelyn Corona López y la Dra. Alma Delia Román Gutiérrez por la revisión de este trabajo.*

*A mi compañera de laboratorio, gracias Sandra Duran por brindarme tu amistad y por apoyarme para poder presentar este trabajo.*

## Índice

.....	I
Lista de figuras.....	III
Lista de tablas.....	III
Lista de ecuaciones.....	IV
Lista de gráficas.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Introducción.....	1
Justificación.....	3
Objetivos.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Capítulo I. Marco teórico.....	5
I.I El pulque.....	5
I.I.1 La historia del pulque.....	5
I.I.2 Composición del pulque.....	7
I.I.3 Composición del aguamiel.....	8
I.I.4 Composición microbiológica del aguamiel, pulque y semilla.....	11
I.I.5 Especificaciones de normatividad.....	12
I.I.6 Proceso de elaboración del pulque.....	14
I.II Métodos de conservación.....	17
I.II.1 Conservación de alimentos.....	17
I.II.2 Métodos de conservación mediante la aplicación de bajas temperaturas.....	21
I.II.2.1 Refrigeración.....	22
I.II.2.2 Congelación.....	22
I.II.2.3 Ultracongelación.....	24
I.II.3 Métodos de descongelación.....	24
I.II.3.1 Descongelación lenta.....	25
I.II.3.2 Descongelación rápida.....	26
I.III. Propiedades fisicoquímicas.....	26
I.IV. Identificación de microorganismos.....	31

Capitulo II. Materiales y métodos .....	35
II.I Método de descongelación .....	35
II.II Métodos de análisis .....	35
II.II.1 Humedad .....	36
II.II.2 Cenizas.....	37
II.II.3 pH .....	37
II.II.4 Sólidos solubles (°Brix) .....	37
II.II.5 Grado alcohólico .....	38
II.II.6 Azúcares totales .....	38
II.II.7 Azúcares reductores .....	38
II.II.8 Acidez total .....	39
II.II.9 Viscosidad .....	39
II.II.10 Proteínas (Método Kjendahl) .....	40
II.IV Identificación microbiológica .....	42
II.V Método de descongelación para la identificación microbiológica .....	42
II.VI Métodos de análisis para la identificación microbiológica.....	42
II.VI.1. Identificación de las cepas aisladas .....	42
II.VI.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	43
Capitulo III. Análisis y discusión de resultados.....	44
Capitulo IV. Conclusiones y perspectivas .....	63
Anexo 1 .....	64
Anexo 2 .....	66
Referencias .....	68

## Lista de figuras

Figura 1. El descubrimiento del pulque, 1860, Museo Soumaya.....	6
Figura 2. El maguey pulquero (Agave salmiana).....	14
Figura 3. Obtención tradicional del aguamiel con acocote. ....	17

## Lista de tablas

Tabla 1. Valores normales del pulque - clasificación en relación a su grado alcohólico. ....	7
Tabla 2. Composición química del pulque de acuerdo a Bulnes F.....	8
Tabla 3. Composición química del aguamiel (Agave atrovirens).....	9
Tabla 4. Características fisicoquímicas de aguamiel de maguey pulquero. ....	9
Tabla 5. Minerales en el aguamiel (Agave atrovirens). ....	10
Tabla 6. Vitaminas hidrosolubles en el aguamiel (Agave atrovirens). ....	10
Tabla 7. Perfil de aminoácidos en el aguamiel (Agave atrovirens).....	10
Tabla 8. Especificaciones de calidad para el Tipo I. y Tipo II de aguamiel. ....	12
Tabla 9. Normas mexicanas de apoyo. ....	13
Tabla 10. Especificaciones de calidad para el Tipo I. Pulque de semilla y puntas y Tipo II. Pulque comercial.....	13
Tabla 11. Agentes causantes del deterioro de un alimento.....	18
Tabla 12. Clasificación de los procesos de velocidad de congelación. ....	22
Tabla 13. Temperaturas de conservación. ....	36
Tabla 14. Azúcares totales 490 nm. ....	49
Tabla 15. Azúcares totales 540 nm. ....	51
Tabla 16. Aspectos considerados durante el almacenamiento a bajas temperaturas. ....	58
Tabla 17. Resumen de los métodos de conservación a bajas temperaturas con valores aceptables. ....	59
Tabla 18. Comparación de parámetros descritos por la normatividad y literatura contra los valores obtenidos para la semilla. ....	60
Tabla 19. Crecimiento de microorganismos a 35°C a partir de pulque almacenado a -80°C. ....	61
Tabla 20. Bacterias lácticas aisladas de pulque artesanal almacenado a bajas temperaturas. ....	61
Tabla 21. Actividad antimicrobiana de las BL <sub>Apan</sub> . ....	62

### Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Peso de la muestra seca .....	36
Ecuación 2. Porcentaje de muestra.....	36
Ecuación 3. Porcentaje de humedad.....	37
Ecuación 4. Peso de la ceniza .....	37
Ecuación 5. Ceniza .....	37
Ecuación 6. Acidez total .....	39
Ecuación 7. Viscosidad relativa.....	39
Ecuación 8. Viscosidad de la muestra.....	40
Ecuación 9. Proteínas .....	41

### Lista de gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de humedad.....	44
Gráfica 2. Porcentaje de cenizas.....	45
Gráfica 3. Valores de pH. ....	46
Gráfica 4. Sólidos solubles en °Brix. ....	47
Gráfica 5. Grado alcohólico en v/v%. ....	48
Gráfica 6. Curva de calibración - azúcares totales. ....	49
Gráfica 7. Azúcares totales (glucosa) en g/100ml. ....	50
Gráfica 8. Curva de calibración - azúcares reductores.....	51
Gráfica 9. Azúcares reductores (glucosa) en g/100ml.....	52
Gráfica 10. Acidez total (ácido láctico) en g/100ml.....	53
Gráfica 11. Viscosidad en cP. ....	55
Gráfica 12. Porcentaje de proteínas.....	56

## Resumen

En la actualidad el consumo del pulque y de sus derivados ha decaído considerablemente debido a su inestabilidad, desde el momento que sale del barril o tinacal donde se elabora tiene una duración de tres días aproximadamente y almacenado en refrigeración hasta cinco días. El pulque de mejor calidad se reserva diariamente como “semilla”, la cual es la base para fermentar el aguamiel de la raspa. Los tlachiqueros suelen quedarse sin semilla y por ende deben conseguir con otros productores afectando la continuidad de la calidad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el comportamiento del aguamiel, pulque y semilla posterior a su conservación a bajas temperaturas (refrigeración, congelación y ultracongelación) con la finalidad de obtener una bebida con estándares de calidad de acuerdo a la normatividad y literatura aplicable. Las muestras fueron recolectadas de un maguey “manso” (*Agave salmiana*) en la localidad de Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo y se realizó su caracterización fisicoquímica (humedad, cenizas, pH, azúcares reductores, azúcares totales, acidez total, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, viscosidad y proteínas (Método Kjendahl) y microbiológica (identificación de microorganismos resistentes a las bajas temperaturas). Se encontró que la muestra conservada de la semilla por el método de ultracongelación durante un periodo de siete días mantiene los valores cercanos a la muestra fresca de semilla. De acuerdo a la norma NMX-V-037-1972 se cumple con algunas especificaciones en las siguientes propiedades fisicoquímicas de la semilla posterior a su conservación; azúcares totales = 0.23069 (glucosa g/100ml) y acidez total = 0.679 (ácido láctico g/100ml) y para la literatura se encontró que los siguientes parámetros se mantienen dentro de lo reportado; humedad = 96.581%, cenizas = 0.207%, sólidos solubles = 5.33 °Brix, azúcares reductores = 0.08254 (glucosa g/100ml), viscosidad = 1.3262 cP y proteínas = 0.1166%. El indicador importante de la calidad es el grado de alcohol, sin embargo desde la muestra fresca no cumple con el valor permitido de la norma y durante su almacenamiento este valor va en aumento.

En el pulque se identificó actividad antimicrobiana en cepas de bacterias lácticas aisladas contra *Salmonella typhimorium*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* posterior al almacenamiento en ultracongelación.

Palabras clave: pulque, bajas temperaturas, *Agave salmiana*, conservación, semilla.



## Abstract

Currently, the consumption of pulque and its derivatives has declined considerably due to its instability, from the moment it leaves the barrel or tinacal where it is made, it lasts approximately three days and stored under refrigeration for up to five days. The best quality pulque is reserved daily as "semilla", which is the base for fermenting the aguamiel from the raspa. The tlachiqueros often run out of semilla and therefore must obtain it from other producers, affecting the continuity of quality. The objective of the present work was to study the behavior of aguamiel, pulque and semilla after its conservation at low temperatures (refrigeration, freezing and deep-freezing) in order to obtain a beverage with quality standards according to the applicable regulations and literature. The samples were collected from a "manso" maguey (*Agave salmiana*) in the locality of Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo, and their physicochemical (moisture, ash, pH, reducing sugars, total sugars, total acidity, soluble solids (°Brix), alcohol content, viscosity and proteins (Kjendahl method) and microbiological (identification of microorganisms resistant to low temperatures). It was found that the sample preserved from semilla by the deep-freezing method for a period of seven days maintained values close to the fresh semilla sample. According to the NMX-V-037-1972 standard, some specifications are met in the following physicochemical properties of the semilla after preservation; total sugars = 0.23069 (glucose g/100ml) and total acidity = 0.679 (lactic acid g/100ml) and for the literature the following parameters were found to be within the reported range; moisture = 96.581%, ash = 0.207%, soluble solids = 5.33 °Brix, reducing sugars = 0.08254 (glucose g/100ml), viscosity = 1.3262 cP and protein = 0.1166%. The important indicator of quality is the alcohol content, however, since the fresh sample does not meet the permitted value of the standard and during storage this value is increasing.

In pulque, antimicrobial activity was identified in lactic acid bacterium strains isolated against *Salmonella typhimorium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* after deep-freezing storage.

Key words: pulque, low temperatures, *Agave salmiana*, preservation, semilla.

## Introducción

El pulque posee un importante valor histórico y cultural, su consumo data desde la época prehispánica, es una bebida fermentada tradicional alcohólica que se produce como resultado de la fermentación de la savia de varias especies de magueyes pulqueros que se dan en casi todo el país (Escalante A. y Gosset G., 2008). La savia que excreta el agave tras ser cortadas las pencas céntricas del tallo se le denomina aguamiel. Esta savia es un líquido translúcido que llega a tener color ámbar, de pH neutro y con ligero olor herbal cuando se encuentra recién secretado. Esta constituido principalmente por agua, azúcares, proteínas, vitaminas y sales minerales (Guzmán R. y Contreras J.). Se ha demostrado que el consumo de pulque tiene muchos beneficios para la salud como un menor riesgo de tener niveles bajos de ferritina y de hemoglobina en mujeres, se considera una buena fuente de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, hierro, probióticos antiinfecciosos y antiinflamatorios. Estas características se presentan por la abundante actividad y diversidad microbiológica con función probiótica en la flora intestinal del consumidor (Rodríguez F. *et al.*, 2021).

La extracción del aguamiel y la elaboración del pulque son realizadas tradicionalmente por el tlachiquero, quien tiene un profundo conocimiento empírico de la biología y cuidado de las especies de maguey utilizadas para la producción del pulque. El proceso de producción comienza con la selección de plantas maduras de 6 a 15 años y consta de cuatro pasos comunes con ligeras variaciones entre las zonas productoras: 1. Castración, 2. Raspado del hueso y extracción de aguamiel, 3. Preparación de semillas y 4. Fermentación (Escalante A. *et al.*, 2016).

La caracterización del aguamiel y el pulque es un tema complejo. Esto se debe a que la producción no está a cargo de un solo microorganismo. En cambio, se ve influenciada por diversos factores, como por el tipo de maguey del cual se obtiene, las condiciones del suelo en el que se cultivó, el clima de la región y la época de recolección. Además las prácticas de inocuidad llevadas a cabo durante su proceso y fermentación desempeñan un papel crucial (Arroyo C. y Reynoso C., 2016).

En la actualidad el consumo del aguamiel ha decaído considerablemente debido a la poca higiene y que es altamente inestable, a causa de la gran cantidad de microorganismos nativos como levaduras y hongos, pH neutro y, por ende, el proceso de fermentación acelerada (3 a 12 horas después de su extracción) (López E., 2018).

Al igual que el aguamiel, el pulque tiene un tiempo de vida limitada. Desde el momento en que el pulque se extrae del barril o tinacal en el que se elabora tiene una duración de tres días aproximadamente. Cuando se refrigera esta vida útil se puede extender hasta cinco días. Aunque algunas empresas han enlatado el pulque

para prolongar su duración hasta 12 meses, pero esto altera su sabor (Balboa K., 2020).

Cabe mencionar que no se conoce un método de conservación actual sobre el aguamiel y el pulque que no implique la adición o eliminación de alguna propiedad del mismo (Arroyo C. y Reynoso C., 2016).

Existen métodos de conservación mediante frío, que implica la aplicación de bajas temperaturas al alimento para prolongar su vida útil. Este enfoque tiene varios beneficios ya que reduce la proliferación o desarrollo de los microorganismos, aunque no los elimina por completo, disminuye la velocidad de las reacciones enzimáticas, manteniendo las cualidades nutritivas y organolépticas de los alimentos sin alterarlos. La aplicación de bajas temperaturas, según su intensidad, se puede llevarse a cabo mediante la refrigeración, congelación o ultracongelación (Salvatierra I., 2019).

Tanto el pulque como el aguamiel y la semilla son bebidas ricas en nutrientes por lo que surge la inquietud de proponer un método alternativo de conservación que mantenga sus propiedades y, que además sea libre de aditivos. Es por eso que en esta investigación se usan las bajas temperaturas para evaluar su efecto en sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

## Justificación

Actualmente la industria del pulque ya no existe, las que fueron haciendas pulqueras ahora se dedican a otras actividades, y los que lo produjeron en aquellos tiempos murieron en su mayoría dejando el conocimiento a sus hijos. Son pocos los tlachiqueros y la producción de la bebida ha dejado de ser una fuente de ingresos importante para sus familias, pero no la tradición, por la cual luchan para mantenerla viva (Erlwein S. *et al.*, 2013).

El pulque se divide en tres clases: campechano o tlachique, fuerte o macizo y pie o semilla. La diferencia entre las tres clases es el tiempo de fermentación. Se considera campechano cuando apenas ha comenzado a fermentar, mientras que el fuerte es aquel cuya fermentación ha terminado y su sabor es más intenso. El pulque más fuerte y de mejor calidad se reserva diariamente como “semilla”. La semilla es la base para fermentar correctamente el aguamiel de la raspa. Un error común que enfrentan los tlachiqueros sin experiencia es consumir o vender la totalidad del pulque y por consiguiente quedarse sin semilla para preparar más. Cuando eso ocurre, se debe conseguir pulque de primera calidad con otro productor para seguir fermentando el aguamiel (Polo D., 2021).

La conservación de la semilla mediante las bajas temperaturas a largo plazo, ayudaría al tlachiquero a tener una reserva del mismo por un determinado tiempo para seguir produciendo durante todo el año obteniendo mayores ingresos y manteniendo la misma calidad.

Se requiere analizar los diferentes métodos de conservación en la semilla y el impacto de estos en sus propiedades fisicoquímicas. Las propiedades por analizar son: humedad, cenizas, pH, azúcares reductores, azúcares totales, acidez total, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, viscosidad y proteínas (Método Kjendahl), estas son la base de referencia para determinar si después de su conservación a bajas temperaturas sigue manteniendo sus características iniciales.

Se considera también la aplicación del método de conservación al aguamiel y pulque obtenidos del mismo maguey, los cuales servirán como comparación del comportamiento de las propiedades de la semilla. Y por otro lado el aislamiento de microorganismos resistentes al frío que se mantienen después de un tratamiento a bajas temperaturas.

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el comportamiento de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del pulque mediante la aplicación de bajas temperaturas durante un tiempo definido, para determinar si se ve afectada la calidad del mismo con base a las referencias de normatividad y literatura aplicable.

## Objetivos específicos

Analizar las muestras del aguamiel, pulque y semilla posterior a su almacenamiento en la refrigeración, congelación y ultracongelación a través de la evaluación de parámetros fisicoquímicos específicos para obtener información sobre las condiciones de conservación.

Evaluar los resultados de las pruebas mediante el análisis comparativo de los parámetros fisicoquímicos para determinar cuál es el método de conservación que mantiene mejor las características fisicoquímicas de la semilla.

Determinar en cuál de los periodos propuestos se conserva mejor las propiedades fisicoquímicas de la semilla por medio de la comparación de resultados posterior a su almacenamiento para evaluar si mantiene la misma calidad.

Identificar que microorganismos del pulque se mantienen después de su almacenamiento mediante análisis microbiológicos específicos para conocer cuáles son resistentes a bajas temperaturas.

## Capítulo I. Marco teórico

### I.1 El pulque

Es una bebida tradicional mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenido a partir de diferentes especies de maguey (Cervantes M. y Pedroza A., 2007), (*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 M.C. *et al.*, 2018). Se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte, viscosa (Cervantes M. y Pedroza A., 2007) y ligeramente acida (Luis G.M. *et al.*, 2019).

#### I.1.1 La historia del pulque

Su origen se remonta a la época prehispánica, en la cual era considerada sagrada, llamada “bebida de los dioses”, posteriormente durante la colonia el pulque se convirtió en el más popular (Navarrete Ma C. y García C., 2021). Era un elemento esencial en la vida ritual que se utilizaba como bebida en las ceremonias o como ofrenda (Luis G.M. *et al.*, 2019) y se reservaba únicamente para sacerdotes, guerreros, ancianos y miembros de la nobleza, su consumo tenía el fin de lograr un estado alterado de la conciencia para que hicieran contacto con los dioses y así tener una mejor concepción de los mensajes que enviaban (Navarrete Ma C. y García C., 2021).

El nombre de pulque entre los mexicanos era *iztacoctli*, vino blanco. Cuando se maleaba o corrompía, entonces era *octli polihqui* y, como fácilmente se descompone o corrompe, sólo dura potable de veinticuatro a treinta y seis horas, las personas que lo elaboraban, expedían o bebían, han de haber pronunciado a menudo la palabra *polihqui* cuando observaban la descomposición; y los españoles, al oír tal palabra, pensaron que con ella se expresaba el nombre de la bebida, y no su mala calidad, y alterando el vocablo formaron el barbarismo *pulque* (Luis G.M. *et al.*, 2019).

La bebida fue llamada de diversas maneras. En el idioma náhuatl existieron varios nombres para referirse a la bebida, como *necuhtli* (pulque suave), *octli* (bebida ofrecida a los dioses), *teoctli* (bebida divina) o *tlaoctli* (vino de la tierra). Al aguamiel recién extraído se le decía *nécuatl* o *tlachiqui*, de donde proviene la palabra tlachiquero: el que sabe explotar la planta para producir pulque. Los nahuas llamaron *metl* al maguey, los *otomís uadá* y los purépechas *tacamba* (Erlwein S. *et al.*, 2013).



Figura 1. El descubrimiento del pulque, 1860, Museo Soumaya.

Fuente: (Preciado J., 2013)

Después de décadas en la época colonial el pulque comienza su acenso como bebida alcohólica de uso común en la mayor parte de la sociedad, teniendo como principales zonas de producción y consumo dentro del país los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y México (Navarrete Ma C. y García C., 2021).

Para mediados del siglo XIX, ya se consideraba como una de las principales actividades económicas, llegando a tener esquemas de control sobre su producción en haciendas pulqueras. Sin embargo, a pesar de ser la bebida más antigua y tradicional de México, el pulque se enfrenta desde hace varios años a un proceso de subvaloración, debido a mitos asociados a su proceso de elaboración, se tiene una mala percepción, ya que es catalogada como una bebida para las clases bajas y se considera antihigiénica por la imagen que tienen los locales que venden el producto (Navarrete Ma C. y García C.). Además, la industria cervecera jugó un papel importante en la campaña de desprestigio contra el pulque ya que difundió muchos mitos alrededor de la bebida, el más conocido: que el pulque se fermentaba con excremento de animal o ser humano (Erlwein S. *et al.*, 2013).

Sin embargo, hoy en día se ha comprobado que el pulque es una bebida única, original y su forma de elaboración es altamente higiénica, puesto que cumple con las normas de salud necesarias (Navarrete Ma C. y García C., 2021).

Además, desde que el pulque dejó de ser un gran negocio y entraron a la región las industrias cerveceras con todo y los sembradíos de cebada, muchos decidieron dejar de sembrar magueyes y producir pulque para dedicarse a la siembra de la cebada, ya que esta actividad les brindaba más ingresos en menos tiempo. En contraste, aquellos que continúan cultivando magueyes y produciendo pulque para autoconsumo o venta a menor escala enfrentan desafíos significativos relacionados con la delincuencia representada por los “mixioteros”. Este término se utiliza para referirse a individuos que extraen la piel del meyolote del maguey cuando éste ha alcanzado la edad adecuada para producir aguamiel (generalmente, entre 8 y 12 años, dependiendo del tipo de maguey). Este acto provoca que la penca gruesa y centro de la planta se sequen, resultando en la muerte completa del maguey, dejándolo inservible (Erlwein S. *et al.*, 2013).

## I.1.2 Composición del pulque

El pulque es el producto de la fermentación del aguamiel de ciertas variedades de *Agave* con una graduación final de alcohol que va de 4 a 6 % vol. Tiene un alto contenido de proteínas, su contenido de carbohidratos le aporta un sabor especial y su alta concentración de bacterias probióticas le proporcionan características medicinales. Sin embargo, no pueden ser considerados productos probióticos por su contenido de alcohol (Luis G.M. *et al.*, 2019).

El valor nutricional que proporciona el pulque se debe al contenido de nitrógeno amínico, que puede reemplazar la falta de aminoácidos como el triptófano y la tirosina, debido a esto es considerado un suplemento alimenticio. Por cada 100 gramos contiene: 4.60 mg de Vitamina C y 0.29 mg de vitamina B2. Además de tener un alto contenido de aminoácidos, enzimas y minerales, contiene hierro, fósforo, tiamina, riboflavina, calcio y niacina, no contiene grasa ni colesterol (Luis G.M. *et al.*, 2019).

Algunos autores han obtenido datos sobre las propiedades físicas y químicas del pulque con lo que se completa la información sobre la composición de esta bebida para determinar calidad de este producto. Gonzalo C. y Cruz L. en 1965, expresaron los valores que en general, pueden considerarse como normales para la calidad como se muestran en la tabla 1.

*Tabla 1. Valores normales del pulque - clasificación en relación a su grado alcohólico.*

Constantes Físicas y químicas	Grupos			
	A 3 a 4	B 4 a 5	C 5 a 6	D Más de 6
pH	3.9 a 4.0	No menos de 4	No menos de 4	No menos de 4
Acidez total En ácido láctico mg/100ml	300 a 700	300 a 700	300 a 700	300 a 700
Valor Ra = $\frac{\text{Acidez fija}}{\text{Acidez volatil}}$	1:4 a 1:7	1:4 a 1:7	1:4 a 1:7	1:4 a 1:7
Índice de refracción	Refractómetro de inmersión a 20°C	Menos de 25	25 a 30	30 a 35
	Refractómetro de ABBE a 20°C	NO menos de 1.3365	1.3365 a 1.3370	1.3370 a 1.3400
Densidad a 20°C	No menos de 1.0000	Menos de 1.0000 a 0.9960	Menos de 1.0000 a 0.9960	Menos de 1.0000 a 0.9960



Reductores totales En glucosa mg/100ml	200 a 500	200 a 500	200 a 500	200 a 500
Proteínas Nx6.25 mg/100ml	300 a 500	300 a 500	300 a 500	300 a 500
Sólidos totales g/100ml	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0	2.0 a 3.0
Cenizas mg/100ml	200 a 500	200 a 500	200 a 500	200 a 500
Esteres En acetato de etilo mg/100ml	10 a 20	20 a 25	25 a 30	30 a 108
Aldehídos En acetaldehído mg/100ml	0.5 a 2.5	0.5 a 2.5	0.5 a 2.5	0.5 a 2.5
Alcoholes superiores mg/l	50 a 80	80 a 100	No menos de 100	100 a 150

Fuente: (Gonzalo C. y Cruz L., 1965)

En la tabla 2 se muestra que hay un estudio desde 1909 donde analizaron las propiedades del pulque siendo la principal el alcohol.

*Tabla 2. Composición química del pulque de acuerdo a Bulnes F.*

<b>Compuestos</b>	<b>%</b>
Alcohol etílico	3.72
Alcoholes superiores	0.0
Materias azoadas (gluco-proteínas)	0.81
Materias gamosas	4.02
Azúcares sin fermentar	1.80
Glicerina	0.09
Ácidos libres	0.18
Agua	88.74

Fuente: (Bulnes F., 1909)

### I.1.3 Composición del aguamiel

Las principales características del aguamiel que es un líquido fresco no fermentado rico en azúcares y proteínas (Luis G.M. *et al.*, 2019).

En la tabla 3 se muestra la cantidad de carbohidratos que contiene el aguamiel. Estos se pueden utilizar para obtener polisacáridos, fructanos o jarabe de alta fructosa. En la industria alimentaria, estos se conocen como probióticos cuando se incorporan a los alimentos (Romero M.R. *et al.*, 2015).

Tabla 3. Composición química del aguamiel (*Agave atrovirens*).

<b>Componentes</b>	<b>Contenido en % de peso en base seca*</b>
Humedad	89.61 ± 0.002
Proteínas	3.50 ± 0.11
Cenizas	3.10 ± 0.23
Fructosa total	32.63 ± 0.06
Glucosa total	28.68 ± 0.02
Fructooligosacáridos	15.51 ± 0.04
Sacarosa	12.90 ± 0.06
Saponinas	1.17 ± 0.10
pH	6.29 ± 0.02
Acidez titulable	0.06 ± 0.02
Sólidos solubles (°Brix)	11.10 ± 0.10

\*Por 100 g en base seca. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Fuente: (Romero M.R. *et al.*, 2015)

La caracterización de las propiedades del aguamiel en diferentes especies de maguey (como se muestran en la tabla 4), se volvió importante debido a que puede ser considerado un alimento funcional por sus propiedades nutritivas principalmente por el contenido de proteínas (Rodríguez F. *et al.*, 2021).

Tabla 4. Características fisicoquímicas de aguamiel de maguey pulquero.

<b>Componentes del aguamiel</b>	<b>Variedades</b>		
	<b>Manzo</b>	<b>Cenizo</b>	<b>Amarillo</b>
Volumen (ml)	2418.64323	2251.875	2345.337
Cenizas (g)	0.534	0.413	0.430
pH	6.3	6.4	6.6
°Brix	11.438	11.0121	12.669
Índice de Refracción	1.352	1.353	1.365
Densidad (g/l)	1.298	1.268	1.231
Acidez (%)	1.649	1.412	1.466
Proteínas (mg/l)	3.409	3.106	2.490
Azúcares reductores (g/l)	1.637	1.973	1.069
Glucosa (mg/l)	2.310	3.12	2.5
Fructosa (mg/l)	4.703	4.928	4.5

0.5% error experimental

Fuente: (Flores A. y Romero L., 2008)

Se han encontrado dentro de las propiedades nutritivas del aguamiel, minerales como el potasio (K) que representa la mayor parte de estos (Tabla 5), vitaminas siendo la principal el ácido ascórbico (Tabla 6) y en el ácido glutámico como el aminoácido con más presencia (Tabla 7).

Tabla 5. *Minerales en el aguamiel (Agave atrovirens).*

<b>Minerales</b>	<b>mg/100g en base seca*</b>
Potasio (K)	120.44 ± 0.10
Calcio (Ca)	11.70 ± 0.30
Plomo (Pb)	0.015 ± 0.00
Zinc (Zn)	0.18 ± 0.01
Hierro (Fe)	0.81 ± 0.20
Sodio (Na)	0.83 ± 0.06
Cobre (Cu)	0.07 ± 0.03
Magnesio (Mg)	0.55 ± 0.07
Selenio (Se)	0.047 ± 0.00

\*Por 100 g en base seca. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Fuente: (Romero M.R. *et al.*, 2015)

Tabla 6. *Vitaminas hidrosolubles en el aguamiel (Agave atrovirens).*

<b>Mineral</b>	<b>mg/100g en base seca*</b>
Tiamina	0.10 ± 0.01
Riboflavina	0.38 ± 0.03
Niacina	4.77 ± 0.30
Piridoxina	0.57 ± 0.15
Ácido ascórbico	17.99 ± 0.20

\*Por 100 g en base seca. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Fuente: (Romero M.R. *et al.*, 2015)

Tabla 7. *Perfil de aminoácidos en el aguamiel (Agave atrovirens).*

<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/100g en base seca*</b>
Acido aspártico	7.91 ± 0.50
Acido glutámico	20.08 ± 0.22
Serina	4.48 ± 0.01
Glicina	2.51 ± 0.08
Histidina	1.84 ± 0.04
Arginina	3.97 ± 0.09
Treonina	2.30 ± 0.06
Alanina	2.38 ± 0.04
Prolina	7.38 ± 0.36
Tirosina	3.58 ± 0.16
Valina	16.35 ± 0.42
Metionina	2.18 ± 0.06
Cisteína	0.48 ± 0.05
Isoleucina	4.68 ± 0.12
Leucina	4.67 ± 0.11
Fenilalanina	10.03 ± 0.15
Lisina	5.17 ± 0.15

\*Por 100 g en base seca. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Fuente: (Romero M.R. *et al.*, 2015)

#### I.1.4 Composición microbiológica del aguamiel, pulque y semilla.

El aguamiel es un medio favorable para el desarrollo no solo de la microbiota natural, sino también los microorganismos provenientes del entorno, durante su acumulación en el maguey. Por ende, durante la fermentación del aguamiel para obtener pulque, este contendrá una gran diversidad microbiana desde de los microorganismos naturalmente del aguamiel, como aquéllos que provienen de la semilla, los que son añadidos al proceso como resultado de la recolección, transporte y manipulación por parte del productor, además de que es producido tradicionalmente en condiciones no asépticas (Gutiérrez E., 2015).

Para obtener pulque a través de aguamiel se involucran tres fermentaciones: ácida, alcohólica y viscosa, los microorganismos involucrados tienen potencial como transportadores de azúcar, enzimas hidrolíticas, exopolisacáridos, ácido láctico o productoras de etanol, los cuales pueden ser aislados (Medina C. *et al.*, 2022).

Al iniciarse la fermentación del aguamiel los cambios químicos que se presentan en el sustrato propician el desarrollo y sucesión de diversos grupos microbianos como los siguientes:

1. Las bacterias productoras de ácido láctico (Luis G.M. *et al.*, 2019) (como *L. mesenteroides*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii* y *L. kéfir* (Escalante A. *et al.*, 2008)) de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (especies homo y heterolácticas) incrementan la acidez de la bebida.
2. Las levaduras no-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* y bacterias (*Zymomonas mobilis ssp. mobilis*), transforman los azúcares en etanol y otros metabolitos secundarios que repercuten en el perfil sensorial de la bebida.
3. Las bacterias productoras (Luis G.M. *et al.*, 2019) (principalmente *L. mesenteroides* (Escalante A. *et al.*, 2008)) de dextranos (*Leuconostoc spp.*), que confieren la viscosidad al pulque.

Las bacterias acéticas (*Acetobacter spp.*) que junto con las bacterias ácido lácticas acidifican la bebida (Luis G.M. *et al.*, 2019).

Se ha propuesto que las bacterias: *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* y *Citrobacter spp.* desarrollan las características sensoriales del pulque y el posiblemente el sabor por las bacterias *L. hilgardii* y *L. kéfir* (Escalante A. *et al.*, 2008).

En cada estadio del proceso de fermentación se han identificado levaduras y bacterias que persisten o reemplazan a otras especies.

En aguamiel se han identificado las levaduras *Candida lusitanae* y *Kluyveromyces marxianus*, así como las bacterias *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc citreum* y *Acetobacter orientalis*.

En pulque se han encontrado, las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, y las bacterias *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc lactis*. En esta bebida existe predominancia de algunos géneros: con un 98% están *Saccharomyces sp.*, *Zymomonas sp.* y *Lactobacillus sp.*

En la semilla, las levaduras *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* y además de las bacterias *Lactobacillus sp.* (Luis G.M. *et al.*, 2019).

### I.1.5 Especificaciones de normatividad

Actualmente existen normas mexicanas que regulan la calidad del aguamiel y pulque desde 1972.

La norma mexicana para el aguamiel es NMX-V-022-1972. AGUAMIEL. HIDROMEL (Dirección general de normas, 1972a). Esta Norma se aplica a las características, recepción, clasificación, valuación y aprovechamiento del aguamiel que, en forma directa o indirecta, sirva como substrato fermentable.

El aguamiel se clasifica en 2 tipos (Tabla 8), con un solo grado de calidad:

- a) Tipo I. Es el aguamiel de mejor calidad (limpio y mayor contenido de azúcares) con él que se elabora la semilla y el pie de cuba
- b) y Tipo II. Se refiere a cualquier otro tipo aguamiel, y se utiliza en la producción de pulque comercial.

Tabla 8. Especificaciones de calidad para el Tipo I. y Tipo II de aguamiel.

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	No menor de
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Beaumé (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20°C	59	100	27
Sólidos totales g/100 ml	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 ml	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 ml	2	6	0.20
Proteínas mg/100 ml	300	600	200
Cenizas mg/100 ml	300	430	180
Acidez mg/100 ml (como ácido láctico)	0.90	1.03	4

Fuente: (Dirección general de normas, 1972a)

También existen normas mexicanas de apoyo las cuales se muestran en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9. Normas mexicanas de apoyo.

<b>Pulque</b>	<b>Aguamiel</b>
NMX-V-040 Método de prueba para determinación de azúcar previa inversión en pulque.	
	NMX-V-041 Determinación de pH.
NMX-V-043 Método de prueba para la determinación de alcohol en volumen en la escala Gay-Lussac.	
NMX-V-045 Método de prueba para la determinación de índice de refracción.	NMX-V-017 Determinación del Extracto Seco y Cenizas en Bebidas Alcohólicas.
NMX-V-042 Método de prueba para la determinación de acidez total.	NMX-V-024 Método de prueba para la determinación del contenido de azúcares, método hidrométrico. NMX-V-029 Determinación de Proteínas. NMX-V-045 Determinación el índice de refracción con el refractómetro de inmersión

Fuente: (Hernández E., 2013)

La norma mexicana para el pulque es NMX-V-037-1972. PULQUE MANEJADO A GRANEL (Dirección general de normas, 1972b). Esta Norma tiene por objeto establecer las características y especificaciones del pulque en el momento de su expedición y hasta la venta al consumidor, de acuerdo con la reglamentación que para el efecto se expida.

El pulque se clasifica en 2 tipos con un grado de calidad cada uno:

- a) Tipo I. Pulque de semilla y puntas
- b) y Tipo II. Pulque comercial, los cuales debe cumplir con las especificaciones de la siguiente Tabla 10.

Tabla 10. Especificaciones de calidad para el Tipo I. Pulque de semilla y puntas y Tipo II. Pulque comercial.

<b>Especificaciones</b>	<b>Tipo I</b>		<b>Tipo II</b>	
	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Grado Refractométrico (Refractómetro de inmersión) a 20°C	32	36	25	-
Índice de refracción (Refractómetro ABBE) a 20°C	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380
pH	3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (ácido láctico) g/100 ml	0.4	0.75	0.40	0.70
Reductores totales (glucosa) g/100 ml	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico % de alcohol por volumen	6	9	4.0	0.6

Fuente: (Dirección general de normas, 1972b)

### I.1.6 Proceso de elaboración del pulque.

El maguey es una planta de la familia *Agavaceae* perteneciente al género *Agave*. Se considera endémica de México y se ha cultivado sobre todo en el altiplano central del país, el cual abarca los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, México, Morelos y Distrito Federal. Se encuentra de manera silvestre en terrenos planos y montañosos, así como en suelos profundos o superficiales.

El maguey pulquero se distingue por sus pencas (hojas) anchas y alargadas con espinas en los bordes, carnosas, casi rígidas, de color verde que llegan a medir hasta dos metros de largo. Tarda en madurar entre ocho y doce años, momento en que comienza a ser explotado para la obtención de aguamiel con el que se elabora el pulque (Valadez M., 2014).



Figura 2. El maguey pulquero (*Agave salmiana*).

Fuente: (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018)

#### Elaboración

La cualidad más importante del pulque está en su legitimidad, la cual se relaciona directamente con su pureza y limpieza. La pureza se asociaba con la calidad del aguamiel, que a su vez es el resultado de, primero, de la habilidad del tlachiquero (un elemento clave en este sistema de producción) (Álvarez M.C. *et al.*, 2018) para reconocer y seleccionar el maguey que debía ser explotado, y segundo, de su conocimiento y cuidado para extraerlo (Valadez M., 2014).

Una tarea primordial del tlachiquero es conocer la etapa de madurez adecuada del maguey para la extracción de aguamiel que, varía entre los 8 y 12 años (algunos otros autores mencionan entre 10 y 14 años) (Valadez M., 2014). El grosor del meyolote (cogollo del maguey) es un rasgo morfológico importante para decidir si la planta está a punto de ser capada (Álvarez M. C. *et al.*, 2018), entre otros rasgos como, la pérdida de espinas de las pencas, así como una coloración más oscura de éstas (Erlwein S. *et al.*, 2013).

La técnica comprende varias fases: “capar”, “picar” y “raspar” el maguey. Para capar, primero se hace un reconocimiento del maguey con el fin de saber si este ha llegado a su etapa de maduración (Valadez M., 2014). En términos propios de la comunidad pulquera tales como: meyahualon, medio hilo, hilo y palmilla. Se utilizan para identificar parte del maguey (meyahualon y palmilla) y el tiempo en que debe ser capado (medio hilo e hilo). Cuando el meyolote está delgado y listo para ser capado se dice que está al hilo y si pasa el momento adecuado se convierte en palmilla (Álvarez M. C. *et al.*, 2018).

Una vez evaluado, se procede a quitar las pencas frontales: con una barreta se abre lo que los lugareños llamaban “la puerta” del maguey, sobre la que apoyan el peso del cuerpo para retirar las pesadas extensiones de la planta y luego las pencas laterales, hasta dejar despejada la zona de trabajo (Valadez M., 2014). Posteriormente, se quiebra la parte superior del meyolote (Erlwein S. *et al.*, 2013) (que es la parte central de la planta, de la cual brota el aguamiel) con un quebrador o cuchillo (Valadez M., 2014)

El tlachiquero pica de acuerdo con las fases de la luna, siendo idónea la luna llena o algunos días después de ella. Para llevar a cabo la picazón él se coloca en la cara del maguey desde lo que fue capado. Posteriormente, con una barreta, empieza a picar la planta, clavándola en los bordes del meyolote (Erlwein S. *et al.*, 2013).

Después de que el meyolote es retirado, se limpia la concavidad de la cual brotará el aguamiel para después rellenarla con los trozos que se obtuvieron al limpiarla; con esto se espera que la piña “sude” y se “pudra”, es decir, que la producción de la savia empiece a acumularse en la piña y ésta fermenta junto con los otros jugos botánicos producidos por la picazón del maguey y los trozos que reposan sobre la concavidad (Erlwein S. *et al.*, 2013).

Tres o incluso seis meses después, se pica de nuevo el meyolote del maguey con una barreta. Luego se limpian las fibras y se retiran los insectos acumulados en el interior para comenzar el “raspado”, que consiste en limar la circunferencia de las paredes de la piña con una herramienta de acero delgado. Este trabajo requiere de una gran precisión y sensibilidad por parte del tlachiquero, ya que la fuerza aplicada sobre el mezontle (que es la piel que cubre al cajete o piña) determina la cantidad (Valadez M., 2014) y calidad de aguamiel que se extraería en los días posteriores (Álvarez M. C. *et al.*, 2018).

Posteriormente, hay que esperar aproximadamente de tres a ocho días, (dependiendo, del agricultor, el desarrollo del maguey y el clima) (Erlwein S. *et al.*, 2013) para que poco a poco la piña comenzara a “llorar” el aguamiel, lo que significa que empieza su etapa plena de producción. Hecho este procedimiento, el tlachiquero comenzaba a recolectar el líquido que se acumulaba en el cajete o piña con el acocote (herramienta alargada hecha con una calabaza seca que se introducía en la piña). El tlachiquero extraía el líquido a fuerza de aspirarlo y luego



lo depositaba en unas castañas de madera que eran cargadas por un burro hasta el tinacal (Valadez M., 2014).

Un tinacal es el lugar donde se lleva a cabo el proceso de fermentación del pulque, puede ser un cuarto de 3x3 metros o mucho más amplio, como lo eran los grandes tinacales de las haciendas pulqueras. Aquí se fermenta el pulque en diferentes recipientes, como tinas fibra de vidrio, de cuero de animal, barriles y recipientes de plástico, entre otros (Erlwein S. *et al.*, 2013).

El proceso comienza en la fermentación del aguamiel en pulque, inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos. Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en aguamiel, sin embargo, el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado semilla (Cervantes M. y Pedroza A., 2007). La semilla es el material de partida o inóculo para la fermentación del aguamiel recién recolectado. El proceso de preparación de la semilla varía entre las zonas productoras de pulque, pero generalmente para su preparación se fermentan entre 10 y 50 L de aguamiel de la mejor calidad en una tina pequeña que se usa solo para la preparación de la semilla, vertiendo un volumen de aguamiel previamente fermentado. Se tapa el recipiente de semillas y se desarrolla la fermentación a temperatura ambiente durante una a cuatro semanas hasta que aparece una capa superior denominada “zurrón” (Valdivieso D. *et al.*, 2021).

El tiempo de fermentación del aguamiel puede durar de 12 a 48 horas a 25° C, cuidando que los recipientes no tengan ninguna sustancia que inhiba los microorganismos mesofílicos (Detergentes, perfumes, desinfectantes, entre otros). A medida que pasa el tiempo se presentan cambios importantes como incremento en el porcentaje de etanol y formación de exopolisacáridos como b-glucanos y dextranos; que generan un incremento en la viscosidad (Cervantes M. y Pedroza A., 2007).

Posteriormente el pulque pasa de una tina a otra. Aunque los mayordomos adecuaban la preparación del pulque, el procedimiento generalmente consiste en pudrir un cubo de aguamiel, equivalente a 25 litros, en una tina perfectamente limpia a la que se denominaba “semillera”. Se procura que dicho aguamiel tenga una graduación alta para que “corte”. Posteriormente, se saca 20 litros de la primera tina, los cuales se colocan en unas tinas llamadas “colas”. Los 20 litros restados a la tina “semillera” se tienen que reponer con una cantidad equivalente de aguamiel. Enseguida se espera a que vuelva a “cortar”, y nuevamente se quitan 15 litros que también son colocados en las “colas”. La reposición de los 15 litros de aguamiel se volvía a repetir y se espera a que vuelva a “cortar”. Como las veces anteriores, se quitan 10 litros que también son repuestos con una cantidad similar de aguamiel. Una vez que vuelve a cortar, ya no se resta volumen a la tina, sino que únicamente se le “da de comer” un cubo de aguamiel tres veces, cada vez que vuelva a cortar.

Después, cada vez que vuelve a “cortar” se le coloca dos cubos de aguamiel. Por último, cada vez que corta se le “da de comer” una carga de aguamiel hasta llenar la tina.

Por otra parte, la pureza también es una cualidad asociada a los conocimientos del mayordomo (dueño del tinacal y patrón directo del tlachiquero). Un pulque puro depende en gran medida de la elaboración de la semilla “nana” o “matriz” del tinacal. Se trata de una receta secreta de los mayordomos. La elaboración de la semilla implica una especie de alquimia en la que se combinan raíces, gomas, brandy o coñac, conservantes naturales y el propio aguamiel con el que “se le daba de comer”.

Además, el tlachiquero debe conocer el tratamiento que se le da al maguey según la época del año. Por ejemplo, en la temporada de calor el horario de recolección es más estricto y el maguey debe “rasparse” temprano para evitar que se “agrie”. Asimismo, se debe evitar que caiga un exceso de polvo en el mezontete, y cuidar que animales silvestres no beban de este y contaminen el aguamiel con su saliva. En la temporada de lluvia, se debe proteger del agua para que el maguey no se “moje” y pierda su sabor (Valadez M., 2014).



*Figura 3. Obtención tradicional del aguamiel con acocote.*

Fuente: (Martínez V., 2020)

## I.II Métodos de conservación

### I.II.1 Conservación de alimentos

La conservación de alimentos, en su contexto más amplio se puede definir como la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro, y así permitir la disponibilidad del alimento para un consumo futuro. La conservación de alimentos utiliza distintas prácticas como mecanismos tradicionales, así como nuevas tecnologías, el objetivo principal es preservar el sabor, los nutrientes, la

textura, entre otros aspectos. Si un producto no logra lo anterior, entonces la conservación no cumple su propósito (Aguilar J., 2012). Para la conservación es necesario conocer la composición química, la tecnología apropiada que se debe aplicar y el empaque más adecuado (Guevara A. y Cancino K., 2008).

Para entender las diferentes prácticas de conservación de los alimentos es necesario conocer las causas del deterioro y su posible prevención. Entre estas causas podemos distinguir, por su origen, los agentes físicos, químicos y biológicos, como su muestra en la tabla 11:

*Tabla 11. Agentes causantes del deterioro de un alimento.*

<b>Agente</b>	<b>Factor</b>
Agentes físicos	Mecánicas
	Temperaturas
	Humedad relativa <sup>1</sup>
	Aire (oxígeno)
	Actividad del agua <sup>1</sup>
	Luz
Agentes químicos	Reacción de oscurecimiento (Maillard) <sup>2</sup>
	Oxidación de vitaminas <sup>2</sup>
	Descomposición proteica (mal olor) <sup>2</sup>
	Fermentación glúcidos (sabor picante) <sup>2</sup>
	Enranciamiento de lípidos
Agentes biológicos	Parásitos
	Microorganismos
	Bacterias Hongos Levaduras

Fuente: Juliarena P. y Gratton R, 2012, <sup>1</sup>Guevara A. y Cancino K., 2008, <sup>2</sup>Aguilar J., 2012.

Los métodos de conservación de los alimentos son aquellos que evitan que las alteraciones antes mencionadas puedan llegar a producirse (Juliarena P. y Gratton R, 2012).

Existen métodos de conservación que se llevan a cabo mediante una inactivación de la carga microbiana, aplicándoles tratamientos como calor, irradiación, altas presiones hidrostáticas y pulsos eléctricos, lo que causa que los microorganismos pierdan su viabilidad y no puedan reproducirse.

También se puede recurrir a métodos de conservación que controlan la carga microbiana, es decir que el microorganismo puede permanecer latente y mientras esté sometido al tratamiento apropiado y en el tiempo planificado, no podrá reproducirse; dentro de estos métodos de conservación se puede considerar la

aplicación del frío, la modificación de atmósfera, los métodos químicos y la concentración (deshidratación, fritado, evaporación, destilación, cristalización, y la adición de solutos) (Guevara A. y Cancino K., 2008).

Por ello, la aplicación de los procesos que lleven a la conservación del aguamiel, pulque y semilla, son importantes, incluso económicamente, tanto para los productores, distribuidores como para los consumidores (Moreno C., 2016). En la actualidad las demandas de alimentos étnicos en la era de la globalización son las principales fuerzas impulsoras para desarrollar un producto estable del aguamiel, pulque y semilla (Escalante A. *et al.*, 2012).

El mayor problema que enfrenta el aguamiel es su rápida fermentación. Los hacendados (propietarios de haciendas pulqueras) tenían algunas formas para evitar la rápida fermentación al ser transportado a las ciudades, una de ellas era colocar un poco de cal en las vasijas que contenían el aguamiel (Balladares E., 2015). La conservación del aguamiel actualmente se ha utilizado para extraer sus oligosacáridos que funcionan como prebióticos y antioxidantes naturales, los cuales pueden ser utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica y de la fermentación, como tal no hay un método que solo conserve al aguamiel para los que se dedican a la producción del pulque (Muñiz D. *et al.*, 2013).

En recientes investigaciones se han encontrado algunos métodos de conservación para el aguamiel como; a) la pasteurización (Chagua P. *et al.*, 2020), b) secado por aspersión, c) termoultrasonido y d) ozonización, que se describen a continuación:

- a) La pasteurización es el proceso utilizado para eliminar ciertos microorganismos, consiste en calentar el alimento a altas temperaturas por un determinado tiempo con el fin de eliminar microorganismos patógenos para la salud humana y la inactivación de enzimas. Existen diferentes métodos para pasteurizar, los cuales se pueden dividir en general con base en la temperatura y el tiempo de exposición al cual es sometido el alimento. Los procesos de pasteurización comunes son la pasteurización lenta o baja, pasteurización relámpago o pasteurización flash (HTST) y ultrapasteurización (UHT). En la pasteurización baja, se calienta a una temperatura de entre 62°C y 65°C durante 30 minutos. En la pasteurización HTST, se calienta entre 71°C y 74°C durante 15 segundos. Finalmente, en la pasteurización UHT, se calienta entre 135°C y 150°C durante 6 segundos. Es importante resaltar que, si las condiciones de tiempo y temperatura no se cumplen, algunos microorganismos patógenos pueden sobrevivir. Por otro lado, el calentamiento excesivo puede disminuir o destruir las propiedades nutritivas presentes en el alimento (Tirado D.F. *et al.*, 2017).
- b) En el secado por aspersión: se emplea aire como medio de calentamiento y de eliminación de humedad. La capacidad del aire para eliminar la humedad depende de su temperatura y de la cantidad de vapor que lleve el aire. Esta operación transforma el alimento líquido hasta una forma en polvo (Rocha M. y Rojas M., 2009).

- c) El ultrasonido: al alimento es sometido a ondas sónicas de 20 kHz (kilohercio) o más vibraciones por segundo. Se puede dividir en dos grupos: ultrasonido de baja intensidad (UBI) (<16 kHz) utilizada para alimentos sólidos y el ultrasonido de alta intensidad (UAI) (>16 hasta 100 kHz) utilizada para alimentos líquidos. Este método no térmico tiene la ventaja de inactivar microorganismos en los alimentos sin causar los efectos secundarios comunes asociados con los tratamientos térmicos convencionales (López E., 2018).
- d) La ozonización: se lleva a cabo por medio de una aspersión de ozono sobre el alimento mediante un equipo que transforma O<sub>2</sub> en O<sub>3</sub>. El ozono (O<sub>3</sub>) es un desinfectante eficaz para destruir bacterias y virus. Se ha reportado que destruye las bacterias por una oxidación progresiva de los componentes celulares, 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 (Corona A., 2021).

El pulque generalmente se consume fresco después de la fermentación, principalmente en áreas rurales, se han dedicado pocos esfuerzos para introducir procedimientos de estabilización. Por lo tanto, hay muchas decisiones con respecto al procesamiento del pulque después de la fermentación que deben tomarse en consideración (Escalante A. *et al.*, 2012). Se han encontrado pocos métodos de conservación del pulque, algunos de ellos son por a) pasteurización, b) adición de alcohol y c) filtración.

- a) Pasteurización: este método implica someter al pulque a temperaturas de pasteurización (Arroyo C. y Reynoso C., 2016) ya que los azúcares no suelen agotarse. En esta bebida es deseable una cantidad residual de agavina y fructooligosacáridos para aumentar los atributos prebióticos del producto (Escalante A. *et al.*, 2012). Con esta tecnología se detiene la fermentación del pulque lo cual brinda la posibilidad de enlatarlo y así transportarlo a grandes distancias y mercados foráneos (Arroyo C. y Reynoso C., 2016).
- b) Adición de alcohol: consiste en adicionar alcohol desinfectado (aguardiente de caña al 85 %) logrando conservar pulque en barricas durante un año (Arroyo C. y Reynoso C., 2016).
- c) La filtración o esterilización: el alimento en forma líquida pasa a través de un filtro que es capaz de retener los microorganismos presentes. Hay varios tipos de filtros, entre los que más se usan son los de profundidad y de superficie o de membrana (Gutiérrez S., 2008). Este método aumenta la estabilidad y vida útil del pulque, pero reduce su contenido de probióticos, también reconocido como uno de los atributos nutricionales del pulque; por otro lado, se busca preservar o complementar su contenido de vitaminas (ácido ascórbico) y hierro no hemo (Escalante A. *et al.*, 2012).

La selección de un empaque adecuado requiere consideración ya que la oxidación biológica y fotoquímica también puede ser un problema en la estabilidad del almacenamiento. El paradigma aquí es que para promover la industrialización del pulque se deben hacer cambios radicales en la percepción pública del pulque, particularmente si se buscan nuevos mercados (Escalante A. *et al.*, 2012).

### I.II.2 Métodos de conservación mediante la aplicación de bajas temperaturas

El frío se utiliza para alargar la vida útil de los alimentos ya que produce una disminución de la velocidad de todos los procesos químicos, metabólicos y de crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, un descenso de la temperatura retrasa los cambios durante el almacenamiento, los cuales serán mayores entre más baja sea la temperatura. Es necesario destacar que aún a baja temperatura, hay microorganismos que son capaces de sobrevivir, por lo cual es importante no interrumpir la cadena de frío (Juliarena P. y Gratton R., 2012).

La conservación mediante el frío no transforma la esencia del producto, esta forma de conservar no cocina, aromatiza o transforma la textura, sabor, color u olor permitiendo alargar el uso en estado natural. En estos tratamientos se debe tener presente, fundamentalmente, la temperatura, la humedad relativa, la circulación y renovación del aire, la estiba y la densidad, así como la duración del almacenamiento que requiere cada alimento conservado (Muñumel J., 2007).

Un elemento importante en la conservación por bajas temperaturas es la velocidad de congelación, la cual se refiere a la velocidad de eliminación de calor o a la velocidad de desplazamiento del frente de congelación, o al tiempo necesario para traspasar un intervalo de temperatura determinado. Se puede considerar la siguiente relación como medida de la velocidad de congelación: "Distancia mínima entre la superficie y el centro crítico (punto que se enfría más lentamente) entre el tiempo que transcurre desde el momento que la temperatura es 0°C en el centro crítico y cuando la temperatura alcanza -18°C, en ese mismo punto". A continuación, se muestra en la tabla 12, los valores que alcanzan las diferentes velocidades de congelación: (Álvarez A., s.f.)

Tabla 12. Clasificación de los procesos de velocidad de congelación.

Velocidad de congelación	Velocidad de descenso de temperatura	Variación de temperatura	Tiempo de congelación
Muy lento	<0.1 cm/h	-17.2°C a -18.8°C/hora	24 horas
Lento	0.1-0.5 cm/h	-16.6°C a -28.8°C/hora	3-74 horas
Rápido	0.5-5 cm/h	-17.2°C a -73.3°C/hora	<30 minutos
Ultrarrápido	>5 cm/h	-12.7°C a -117.7°C/segundos	segundos

Fuente: (Belén D. *et al*, 2005)

A continuación, se describirán los principales métodos de conservación aplicados por el efecto de frío o de las bajas temperaturas: refrigeración, congelación y ultracongelación.

### 1.11.2.1 Refrigeración

La refrigeración es una técnica de conservación a corto plazo (entre dos a quince días dependiendo el alimento (Aguilar J., 2012). Consiste en la conservación de los productos a bajas temperaturas, pero por encima de su temperatura de congelación (Umaña E., 2007). De manera general, en la refrigeración se elimina el calor sensible y metabólico entre una temperatura de -1°C y 8°C (Arias S. *et al.*, 2019). De esta forma se consigue que el valor nutricional y las características organolépticas casi no se diferencien de las de los productos al inicio de su almacenaje. La refrigeración evita el crecimiento de los microorganismos termófilos que crecen a una temperatura arriba 45°C como *Bacillus* y *Clostridium* además de algunas algas y hongos, así como de algunas bacterias mesófilas que pueden crecer a temperaturas de entre -5°C a -7°C (Umaña E., 2007).

### 1.11.2.2 Congelación

Existen otras técnicas para la conservación de alimentos, una de las más utilizadas es la congelación, la cual se fundamenta en la solidificación del agua durante el proceso, generando una alta concentración de sólidos solubles lo que provoca una baja en la cantidad de agua libre. La congelación es un medio excelente para mantener casi inalteradas durante un tiempo prolongado las características originales de alimentos perecederos (Arroyo C. y Reynoso C., 2016).

Este tipo de conservación radica en la disminución de la temperatura, generalmente entre -20°C a -30°C, lo cual permite que las reacciones bioquímicas sean más lentas, lo cual evita el deterioro al disminuir la actividad enzimática y las reacciones oxidativas (Gómez A. *et al.*, 2007). Además, inhibe la actividad microbiana, y las bacterias dejan de reproducirse de -5°C a -8°C, las levaduras de -10°C a -12°C y los hongos de -12°C a -18°C (Aguilar J., 2012), generando el estado de latencia de éstos, lo que no significa que los microorganismos estén muertos (Umaña E.,

2007). Durante el proceso se elimina calor latente (Arias S. *et al.*, 2019) produciendo la solidificación del agua libre presente en el alimento, es decir, el agua contenida es transformada en hielo a una temperatura habitual de  $-18^{\circ}\text{C}$ , disminuyendo así la actividad de agua del sustrato (Arroyo C. y Reynoso C., 2016). Si al almacenar los alimentos, se desea conservarlos por un tiempo suficiente para comercializarlos, se debe cumplir con el mínimo de grados de congelación  $-18^{\circ}\text{C}$  (Aguilar J., 2012).

Por consecuencia, el empleo de congelación como método de conservación, generalmente resulta en el incremento de la calidad de los productos; sin embargo, dicha calidad se ve influenciada por el proceso de congelación y las condiciones de almacenamiento. La velocidad y el tiempo de congelación son factores importantes que determinan la calidad final del producto. Para algunos productos, la congelación rápida es requerida para asegurar la formación de cristales pequeños en la estructura del producto y con ello minimizar el daño a la textura. En otros productos que no requieren cuidado de la textura, no se justifica el gasto de una congelación rápida. Sin embargo, existen productos que por su configuración geométrica y tamaño no es posible que se les aplique una congelación rápida. Las condiciones de almacenamiento influyen de gran manera a la calidad de los productos congelados, debido a que, si durante esta etapa no hay un adecuado manejo y control de la temperatura, se puede presentar el defecto de recristalización, provocando pérdidas de calidad y modificación de la estructura del producto (Gómez A. *et al.*, 2007).

Existen tres modalidades de congelación: lenta, rápida y ultrarrápida.

- Congelación Lenta

Cuando la congelación es lenta la cristalización extracelular aumenta la concentración local de solutos lo que provoca, por ósmosis, la deshidratación progresiva de las células. En esta situación se formarán grandes cristales de hielo aumentando los espacios extracelulares, mientras que las células plasmolizadas (pierden agua por estar expuesta una presión osmótica mayor) disminuyen considerablemente su volumen. Este desplazamiento del agua y la acción mecánica de los cristales de hielo sobre las paredes celulares provocan afecciones en la textura y dan lugar a la aparición de exudados durante la descongelación (Umaña E., 2007).

- Congelación Rápida

Cuando la congelación es rápida la cristalización se produce casi simultáneamente en los espacios extracelulares e intracelulares. El desplazamiento del agua es pequeño, produciéndose un gran número de cristales pequeños. Por todo ello las afecciones sobre el producto resultaran considerablemente menores en comparación con la congelación lenta. No obstante, velocidades de congelación muy elevadas pueden provocar en



algunos alimentos, tensiones internas que pueden causar el agrietamiento o rotura de sus tejidos, congelar demasiado rápido tomates u otros vegetales o frutas con alto contenido de agua. Existen diversas maneras de definir la velocidad de congelación siendo estas: el tiempo característico de congelación o duración de la congelación, el tiempo nominal de congelación, la velocidad media de congelación, entre otros. Por definición, la velocidad de Congelación ( $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ) es el cociente de la diferencia entre la temperatura inicial y temperatura final por la duración de la congelación (Umaña E., 2007).

### *I.II.2.3 Ultracongelación*

La ultracongelación consiste en una congelación a una temperatura muy baja, menor de  $-40^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo rápido (Álvarez T., 2021) de 2 horas como máximo (dependiendo del tipo de producto) (García R. *et al*, 2016), lo que permite conservar la textura y la rápida inactivación de los procesos enzimáticos (Quintero S. y Bonilla M., 2018). El proceso se completa una vez lograda la estabilidad térmica en el centro térmico del alimento alrededor de  $-18^{\circ}\text{C}$  o inferior (Garrido M. *et al.*, 2020). Por tanto, el alimento debe ser almacenado a una temperatura igual o inferior a la misma (Quintero S. y Bonilla M., 2018). A diferencia de la congelación, en la ultracongelación el descenso de la temperatura se realiza de forma muy rápida, por lo que los microcristales que se forman en el interior de las células durante el proceso de congelación, producen cambios significativos en las propiedades de dicho alimento (Garrido M. *et al.*, 2020). Entre tales propiedades se tiene la densidad, conductividad térmica, entalpía, difusividad térmica, calor latente y calor específico; propiedades que a su vez dependen de factores relacionados con la composición de los productos, contenido de humedad, temperatura y constituyentes de los mismos alimentos (García R. *et al*, 2016). Por ello, en la descongelación de los productos, se produce una mínima la pérdida de los líquidos procedentes de su interior (Garrido M. *et al.*, 2020).

### *I.II.3 Métodos de descongelación*

Hay varias maneras de descongelar alimentos sin exponerlo algún peligro, pero si este proceso se hace de forma errónea, aumenta el riesgo de exposición a bacterias, pérdida de la calidad y tiempo de vida del alimento (Hernández O., 2013). Los alimentos deben ser descongelados adecuadamente para minimizar el tiempo que se encuentra en la temperatura de la zona de peligro (FDACS, 2017) entre  $4.4^{\circ}\text{C}$  y  $60^{\circ}\text{C}$ , y cualquier bacteria patógena puede comenzar a multiplicarse (USDA, 2013).

La descongelación se considera completa cuando el centro del alimento alcanza a  $0^{\circ}\text{C}$  y se considera atemperado cuando se llega a temperaturas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-3^{\circ}\text{C}$ .

Durante la descongelación, los alimentos deben mantenerse a temperaturas adecuadas.

El tiempo de duración del descongelado es variable ya que depende de la temperatura inicial de congelado, la masa a descongelar, el tipo de producto y el método elegido de descongelación (Hernández O., 2013).

A continuación, se describen los métodos adecuados:

### *1.II.3.1 Descongelación lenta*

- Refrigerador

Los alimentos deben permanecer dentro de sus envases durante todo el periodo de descongelación (Hernández O., 2013), manteniendo a una temperatura de 5°C o menor (FDACS, 2017). El tiempo de descongelación de los productos dependerá del tamaño y de la naturaleza de los mismos (Hernández O., 2013). Es el método más seguro para descongelar (FDACS, 2017).

- Agua fría

Este método es más rápido que el descongelar en el refrigerador, pero requiere de más atención (USDA, 2013). Los alimentos deben mantenerse en sus envases para no perder parte de sus vitaminas hidrosolubles o favorecer su contaminación. Se pueden descongelar manteniendo el alimento bajo el grifo o metiéndolo bajo el agua (Hernández O., 2013), cambiando el agua cada 30 minutos para que continúe descongelándose (USDA, 2013). El agua debe de correr constantemente, y tener una temperatura de 21.1°C o menos. El período de tiempo bajo el agua corriente no debería permitir que las partes descongeladas de la comida se eleven por encima de los 5°C (FDACS, 2017).

- A temperatura ambiente

A pesar de ser la técnica más empleada, no es aconsejable ya que puede favorecer la multiplicación de los microorganismos que se encuentran en el alimento. Es preferible emplearla para cosas que se descongelen rápidamente (Hernández O., 2013).

### *I.II.3.2 Descongelación rápida*

- Horno tradicional y microondas

Es el método más indicado para descongelar todo tipos de productos. Es recomendable hacer pausas para que la temperatura del producto se iguale, ya que la parte externa alcanza altas temperaturas, lo que puede provocar su alteración (Hernández O., 2013). Funciona bien para pequeñas cantidades de alimentos (FDACS, 2017). Lo ideal es cocinarlos inmediatamente después de descongelarlos (USDA, 2013).

- Por cocción

Se cocinan los alimentos a una temperatura interna segura 73.8°C. Funciona bien para pequeñas cantidades de alimentos (FDACS, 2017).

### *I.III. Propiedades fisicoquímicas*

El análisis de alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características y sus componentes (Iturbe F. y Sandoval J., 2011). Unos de estos procedimientos analíticos son las propiedades fisicoquímicas que es uno de los aspectos principales en el aseguramiento de la calidad. La caracterización desde el punto de vista fisicoquímico, analiza el contenido de las sustancias presentes y la cantidad de estos compuestos, este tipo de análisis cumple un papel muy importante en la determinación del valor nutricional, en el control del cumplimiento de los parámetros exigidos por los organismos de salud y también para el estudio de las posibles irregularidades como adulteraciones, falsificaciones, entre otras, tanto en alimentos terminados como en sus materias primas. Es importante realizar un análisis para asegurar que sean aptos para el consumo humano y para asegurar que cumplen con las características y composición que se espera de ellos. Así como también deben ser comparados con los límites establecidos en los documentos técnicos y normas según el alimento que sea analizado (Porras O., 2018).

El método seleccionado dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y el propósito de llevar a cabo el análisis (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

Algunas de las propiedades fisicoquímicas que se describirán para este trabajo de investigación son de acuerdo a la norma NMX-V-037-1972.

- Humedad

Todos los alimentos contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre 60 y 95% en los alimentos naturales. Existen en dos formas generales: “agua libre” y “agua ligada”. El agua libre es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se encuentra combinada o absorbida en los componentes de los alimentos (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

Esta propiedad determina cuanta cantidad de agua contiene un alimento y se obtiene por métodos de secado en el cual se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Algunas desventajas que puede presentarse son: a) en ocasiones es difícil eliminar por secado toda la humedad presente, b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

- Cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica, las cuales representan el contenido en sales minerales (Iturbe F. y Sandoval J., 2011). Este proceso se lleva a cabo mediante la incineración para destruir toda la materia orgánica, las sales metálicas de los ácidos orgánicos se convierten en óxidos o carbonatos y reaccionan durante la incineración para formar fosfatos, sulfatos o haluros y algunos elementos, como el azufre y los halógenos, pueden no ser completamente retenidos en las cenizas perdiéndose por volatilización. La determinación debe hacerse aumentando progresivamente la temperatura del horno, hasta alcanzar el rojo oscuro ( $\pm 550^{\circ}\text{C}$ ). No se debe sobrepasar la temperatura para evitar la descomposición de los carbonatos presentes porque se volatilizarían otras sustancias como los compuestos de fósforo produciendo resultados erróneos (Méndez L., 2020).

- pH

Soren Sorensen propuso, en 1909 una medida más práctica para medir el pH. EL pH de una disolución se define como *el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrogeno (en mol/L):*  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$  (Chang R. y College W., 2002).

Debido a que el pH solo es una manera de expresar la concentración del ion hidrogeno, las disoluciones acidas y básicas a 25°C se identifican por sus valores de pH, como se muestra a continuación:

Ácidas:  $[H^+] > 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $\text{pH} < 7$   
Básicas:  $[H^+] < 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $\text{pH} > 7$   
Neutras:  $[H^+] \approx 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7$

Se observa que el pH aumenta a medida que el ion hidrogeno  $[H^+]$  disminuye (Chang R. y College W., 2002).

En los laboratorios el pH de una disolución se mide con un potenciómetro (Chang R. y College W., 2002), el cual cuenta con un bulbo sensor que se introduce en la disolución en dicho bulbo se encuentran dos electrodos: uno calibrado y otro sensible a los iones  $H^+$ , al activarlo la diferencia de potencial entre los electrodos informa en una pantalla digital sobre el valor exacto del pH en la muestra analizada (Chemical and foods, 2022).

- Azucares reductores

Estos azucares poseen un su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores en otras moléculas (González L. *et al*, 2000). Según el método Miller, los azúcares reductores pueden reducir a un grupo nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones, para dar el producto monoamino correspondiente (Iturbe F. y Sandoval J, 2011). Cuando el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido en presencia de calor, por los azúcares reductores que entran en contacto con él, se desarrolla un cambio de color parecido al café (con variaciones de amarillo hasta café). El cambio de coloración puede entonces determinarse por lecturas de densidad óptica, leídas por espectrofotometría a una determinada longitud de onda. La absorción de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo una interpolación en la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración (Ávila R. *et al.*, 2012).

- Azucares totales

Los carbohidratos son compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Los carbohidratos se pueden dividir en tres grupos: a) monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa), b) disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa) y c) polisacáridos (almidón, glicógeno, celulosa) (Latham M., 2002).

Los carbohidratos pueden determinarse a partir del porcentaje remanente de la cuantificación de los principales componentes del alimento. Es decir: % Carbohidratos = 100 - % humedad - % proteína - % lípidos - % minerales. Sin embargo, este método podría obtener resultados erróneos debido a las fallas experimentales de la cuantificación del resto de los componentes. Por eso, es recomendable determinar la fracción de carbohidrato de interés para obtener mayor precisión (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

Para eso se puede llevar a cabo el método fenol-sulfúrico espectrofotométrico propuesto por Dubois en 1956. Se fundamenta en que los carbohidratos en medios fuertemente ácidos y altas temperaturas, sufren deshidrataciones simples y producen varios derivados del furano que se condensan con el fenol, dando origen a compuestos coloridos. Este método es fácil, eficaz y rápido. Todos los azúcares, como oligosacáridos y polisacáridos, pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica, y depende de la estructura del azúcar; por lo tanto, se realiza una curva patrón (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

- Sólidos solubles (°Brix)

Los sólidos solubles permiten determinar principalmente la cantidad de fructosa y ácidos orgánicos presentes en los alimentos, estos son medidos a través del método Refractométrico, el cual mide de la cantidad de rayos luminosos que se desvían al pasar de un medio transparente de densidad determinada a otro medio (la muestra). La temperatura es un parámetro que debe tenerse en cuenta ya que, si esta aumenta el índice de refracción disminuye, en general se presenta esta disminución por el descenso de la densidad y de la constante dieléctrica del medio (Porras O., 2018).

- Acidez total

La acidez titulable según Salhuana (1999), son utilizadas como parámetros de calidad en los alimentos; donde, la acidez total puede ser medida por titulación con un álcali hasta un punto final que depende del indicador seleccionado y el resultado se puede expresar en términos de un ácido en particular. El valor de la titulación indica en tanto por ciento, ácidos grasos libres, y puede expresarse en porcentaje (Rodríguez J. *et al.*, 2016), pero no indica si los ácidos que están presentes son fuertes o débiles (Trujillo S. y Claros A., 2020).

La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos, es decir, midiendo los volúmenes. Esta medición se realiza mediante una

titulación, la cual implica siempre tres agentes o medios: el titulante, el titulado y el colorante. Cuando un ácido y una base reaccionan, se produce una reacción; reacción que se puede observar con un colorante. Un ejemplo de colorante, y el más común, es la fenolftaleína ( $C_{20}H_{14}O_4$ ), que cambia de color a rosa cuando se encuentra presente una reacción ácido-base. El agente titulante es una base, y el agente titulado es el ácido o la sustancia que contiene el ácido (Trujillo S. y Claros A., 2020).

- Porcentaje de alcohol

La graduación alcohólica se expresa en grados y lo que mide es el contenido de alcohol absoluto en 100 cc o, lo que es lo mismo, el porcentaje de alcohol que contiene una bebida. Es decir, que un vino tenga 13 grados significa que 13 cc de cada 100 cc = 13% es alcohol absoluto. El grado alcohólico viene expresado en los envases como (°) o bien como vol % (Balaguera A. *et al.*, 2018).

Desde la perspectiva sanitaria tiene mayor relevancia determinar los gramos de etanol absoluto ingerido, y no el volumen de bebida alcohólica (Ministerio de sanidad y consumo., 2007).

El grado alcohólico de una bebida es el contenido de alcohol etílico expresado en volumen de alcohol por 100 ml de bebida, o en gramos de alcohol por 100 ml de bebida si se expresa como grado alcohólico en peso. Los métodos de determinación se basan en la destilación del alcohol etílico y otros componentes volátiles (metanol, alcohol isopropílico, aldehídos, ésteres) el enrase a un volumen determinado y la medida de la densidad o el índice de refracción (ASSAL, 2010).

- Viscosidad

Es la resistencia de un líquido a fluir. La unidad de viscosidad es el poise ( $g/cm\ s$ ); más comúnmente, se usa un submúltiplo de ella, el centipoise. Es importante considerar la relación definida que existe entre la viscosidad y la temperatura, razón por la cual ésta debe mantenerse constante al hacer las mediciones para obtener resultados comparables. Casi nunca se reporta en términos de viscosidad absoluta, sino como viscosidad relativa, o sea la viscosidad de la sustancia comparada con la viscosidad de un líquido en referencia, generalmente el agua. La viscosidad se mide por medio de viscosímetros los cuales están basados principalmente en principios tales como: flujo a través de un tubo capilar (viscosímetro de Ostwald, Cannon-Fenske); flujo a través de un orificio (viscosímetro de Saybolt); rotación de un

cilindro o aguja en el material de prueba (viscosímetro de Stormer y Brookfield) (Porras O., 2018).

- Proteínas

El término proteína se aplica a gran número de compuestos nitrogenados. Estructuralmente, son polímeros cuyas unidades básicas son amino o aminoácidos, unidos por un enlace característico que recibe el nombre de enlace peptídico. La secuencia de grupos aminoácidos caracteriza a una proteína y las propiedades físicas, químicas y nutricionales dependen de la composición en aminoácidos de la molécula proteica y de la forma como se enlazan para conformar su estructura (Méndez L., 2020).

Se determina frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales y puesto que el nitrógeno representa en la mayoría de las sustancias proteicas un porcentaje relativamente constante, alrededor del 16%, su determinación sirve como una medida del contenido proteico en los alimentos (Méndez L., 2020). Para convertir el nitrógeno a proteína, se emplea el factor de 6.25 (Iturbe F. y Sandoval J., 2011).

En la NOM-F-68-S-1980, se describe que este método se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO<sub>2</sub>, el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio. El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra (Dirección general de normas (1980).

#### I.IV. Identificación de microorganismos

La identificación bacteriana se pueden dividir en dos grupos en fenotípicas (se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características) y genotípicos (suelen reservarse para las bacterias que no se pueden identificar con métodos convencionales). La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características observables, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas.

Todas las características fenotípicas son importantes, cuando se inicia el proceso de identificación, se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, como la morfología en la tinción de Gram u otras



tinciones, crecimiento en diferentes atmosferas de incubación, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo, oxidasa y catalasa (Fernández A. *et al.*, 2010).

Para la identificación bacteriana de este trabajo se seleccionaron las siguientes pruebas:

Medios de cultivo:

- Agar APT: es un medio de cultivo apropiado para aislamiento y cuenta de Lactobacilos heterofermentativos y otros microorganismos exigentes que requieren de un alto contenido de tiamina, a partir de diversas muestras. Contiene triptona que es una fuente de nitrógeno y el extracto de levadura por su elevado contenido en vitaminas proporciona condiciones adecuadas para el desarrollo de los microorganismos. También tiene polisorbato 80, tiamina y otros elementos esenciales incluidos, que proporcionan condiciones óptimas de crecimiento. Al ser un medio no selectivo, pueden crecer en forma abundante otros microorganismos acompañantes (Dibico APT, s.f.).
- Agar MRS: es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos). El Agar MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación. Este medio contiene: proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa que constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. También provee cofactores para el crecimiento bacteriano como: el monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso, al igual estos pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. Para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas contiene como agente el citrato de amonio (Britanialab, 2021).
- Agar PDA: es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en productos lácteos, bebidas embotelladas y alimentos. Como medio preparado se utiliza para la cuenta de hongos y levaduras en líquidos. Tanto la infusión de papa (fuente de almidones) y la dextrosa favorecen el desarrollo de hongos y levaduras (Dibico PDA, s.f.).

Prueba bioquímica de catalasa

El metabolismo aerobio-oxidativo es una vía metabólica la cual oxida carbohidratos dando como producto final peróxido de hidrógeno. La acumulación del peróxido es muy tóxica por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas

exceptuando a *Streptococcus sp.*, producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno gas.

El reactivo utilizado para la prueba es el peróxido de hidrógeno al 30%, Existen diferentes técnicas para realizar la prueba la más común es poner una gota de peróxido en el portaobjetos y posteriormente con un asa tomar un poco de bacteria a partir de una colonia aislada, si se observa el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de la enzima catalasa, hay bacterias que dan una reacción positiva débil (MacFaddin J., 2003).



Reacción química de la catalasa.

### Tinción Gram para identificar su morfología

Una de las características más importante de las bacterias es su morfología, definida por el tamaño, la forma, el arreglo y la estructura, que pueden determinarse examinando muestras al microscopio. Existen bacterias en forma redondeada denominadas cocos, en forma cilíndrica, denominadas bacilos y una tercera morfología como son las que tienen forma de espirales, denominadas espirilos. A su vez cada categoría puede subclasificarse con base a diferentes arreglos.

Como tal las células son prácticamente transparentes, pero pueden observarse al microscopio de luz haciendo preparaciones entre lámina y laminilla o con microscopios especiales como, por ejemplo: de contraste de fases o de campo oscuro.

Cuando se dispone de un microscopio de luz, se pueden teñir las bacterias para facilitar su visualización. Si se tiñe una muestra del cultivo extendida y fijada en una lámina portaobjeto con un colorante dado, las células adquirirán el color del colorante añadido y podrá observarse la forma, tamaño y el arreglo de las mismas. Este tipo de coloración se conoce con el nombre de coloración simple.

Para obtener mejor información sobre la morfología y composición química de las bacterias, debe recurrirse a tinciones diferenciales que involucran el uso de varios reactivos y éstas pueden diferenciarse con base al color que retienen, como lo es la Tinción de Gram (Vizcarrondo M. y Gutiérrez S., 2008).

La Tinción de Gram consiste en una técnica de diferenciación según la distribución del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias que las envuelve y se tiñen de una forma u otra.

Las bacterias que no se tiñen mediante esta técnica se denominan Gram negativas, debido a que su pared es más fina la cual está formada por menos capas de

peptidoglicano y tienen una segunda membrana rica en lípidos que repele la tinción Gram y al observarse al microscopio aparecen incoloras.

Para la identificación de bacterias Gram positivas y negativas, se utiliza el reactivo cristal violeta que se une a la pared bacteriana y se estabiliza con el Lugol para las bacterias Gram positivas, para las Gram negativas se estabiliza con la mezcla alcohol-acetona, extrayéndose el cristal violeta y posterior se tinen con safranina (Estrada S., 2020).

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Se lleva a cabo mediante agentes antimicrobianos que tienen como principal objetivo inhibir a los microorganismos como bacterias y hongos, presentes en un medio de control los cuales previenen y controlan el crecimiento de microorganismos patógenos y causantes del deterioro (Reyes F. *et al.*, 2014).

## Capítulo II. Materiales y métodos

Las muestras recopiladas para realizar este trabajo fueron obtenidas en agosto y octubre del 2017, en la localidad de Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo con un productor local que elabora el pulque en su casa. Las muestras analizadas fueron aguamiel fresco recién extraído de maguey “manso” (*Agave salmiana*), pulque fresco del día y el pulque semilla. El aguamiel fue recolectado por el mismo productor por medio de succión oral con un acocote siendo la primera raspa del día y el pulque semilla provenía de una fermentación anterior. Las muestras fueron recolectadas en un recipiente PET (Tereftalato de polietileno) de dos litros sin esterilizar, el cual utiliza el productor para vender su producto. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Química de la Escuela Superior de Apan para su procesamiento.

### II.I Método de descongelación

Para descongelar las muestras, se aplicó una descongelación lenta. Las muestras fueron colocadas en un recipiente con una corriente continua de agua fría, una vez que las muestras empiezan a descongelarse, se colocan en agitación hasta su completa descongelación.

### II.II Métodos de análisis

Para realizar el método de análisis se usó de referencia la metodología de García (2017), a la cual se ajustó el orden de las pruebas tomando como criterio principal el tiempo en el que se realizan y se obtienen resultados. Debido a que el aguamiel tiene una rápida fermentación de entre 3 a 12 horas la cual va variando de acuerdo a la temperatura ambiente.

Se procede a determinar las siguientes propiedades fisicoquímicas tomando en cuenta el tiempo de obtención de los resultados: humedad, cenizas, pH, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, azúcares totales, azúcares reductores, acidez total, viscosidad y proteínas (Método Kjendahl), del aguamiel, pulque y pulque semilla a diferentes bajas temperaturas.

Primero se realizan las pruebas de humedad y cenizas ya que el procedimiento de preparación es más rápido que la obtención de los resultados. Mientras estas se están procesando se realizan las pruebas de pH, sólidos solubles (°Brix) y grado alcohólico ya que el procedimiento es fácil y los resultados son inmediatos. Se continúa con azúcares totales y azúcares reductores ya que el procedimiento de realización no es tan rápido pero ambas pruebas ocupan el mismo equipo para leer los resultados.

Para concluir, se dejan las siguientes pruebas: acidez total, viscosidad y proteínas (Método Kjendahl), el orden mencionado es de acuerdo al ascenso del método de dificultad para realizarse también tomando en consideración que requieren completamente atención para cada una de las pruebas.

En la tabla 13 se muestran las temperaturas a las que fueron conservadas las muestras:

*Tabla 13. Temperaturas de conservación.*

<b>Equipo de conservación</b>	<b>Temperatura</b>
Refrigerador	2.5 °C
Congelador	-15.6 °C
Ultra congelador	-80 °C

### II.II.1 Humedad

Se colocó 5 ml de muestra en charolas de aluminio a peso constante, las cuales se introdujeron a una estufa a 105°C durante aproximadamente 4 horas. Por último, se sacaron de la estufa, colocando las muestras en un desecador y se pesaron nuevamente hasta que se obtuvo un peso constante. Se realizó el método por duplicado por cada muestra (Asociación Oficial de Químicos Analistas, 1990)

Los cálculos y la expresión de resultados en porcentaje se realizaron de la siguiente manera:

Obtención del peso de la muestra seca con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso de la muestra seca (g)} = \text{peso de la charola con la muestra seca(g)} - \text{peso de la charola vacía(g)}$$

*Ecuación 1. Peso de la muestra seca*

Posteriormente se calculó el porcentaje de muestra seca de acuerdo a la cantidad de muestra utilizada:

$$\% \text{ de muestra seca} = \frac{\text{peso de la muestra seca (g)}}{\text{cantidad de muestra (ml)} * \text{densidad } \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)} * 100$$

*Ecuación 2. Porcentaje de muestra*

\*El valor utilizado para la densidad fue obtenido experimentalmente con un picnómetro de 10 ml.

Por último, se obtuvo el porcentaje de humedad se considera que el porcentaje obtenido en la muestra seca es masa y el resto agua:

$$\text{Humedad (\%)} = 100\% - \% \text{ de muestra seca}$$

*Ecuación 3. Porcentaje de humedad*

## II.II.2 Cenizas

En crisoles a peso constante se colocaron 3 ml de muestra y se incineraron en una parrilla de calentamiento, hasta que la muestra dejó de desprender humo. Posteriormente se colocaron en una mufla a 550°C hasta que se obtuvieron cenizas blancas al fondo del crisol. Se realizó el método por duplicado por cada muestra (García E., 2017).

Los cálculos y la expresión de resultados en porcentaje se realizaron de la siguiente manera:

Obtención del peso de la muestra en cenizas con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso de la ceniza (g)} = \text{peso del crisol con la ceniza (g)} - \text{peso del crisol vacío (g)}$$

*Ecuación 4. Peso de la ceniza*

Una vez obtenido el peso de la ceniza aplicaremos la siguiente ecuación 5.

$$\text{Ceniza (\%)} = \frac{\text{peso de la ceniza (g)}}{\text{cantidad de muestra (ml)} * \text{densidad } \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)} * 100$$

*Ecuación 5. Ceniza*

\*El valor utilizado para la densidad fue obtenido experimentalmente con un picnómetro de 10 ml.

## II.II.3 pH

Se realizó de acuerdo a la NMXV-041-1972. El tamaño de las muestras se ajustó dependiendo de la cantidad de producto disponible, se sometió a una agitación durante 2 minutos con el fin de eliminar el exceso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Después de este procedimiento se midió el pH con un potenciómetro. Se realizó el método una vez por cada muestra.

## II.II.4 Sólidos solubles (°Brix)

Se realizó de acuerdo a la NMX-V-045-1972, para lo cual se colocó una gota de cada muestra de estudio en un refractómetro digital de mano. Se realizó el método por triplicado por cada muestra.

### II.II.5 Grado alcohólico

Se determinó por refractometría, para lo cual se colocó una gota de cada muestra en un refractómetro digital de alcohol etílico. Se realizó el método por triplicado por cada muestra.

### II.II.6 Azúcares totales

Se realizó mediante el método Fenol-Sulfúrico de DuBois, el cual se basa en la determinación de la absorbancia en un espectrofotómetro a una lectura de 490 nm.

Primero se realizó una curva de calibración para la cual se preparó una solución estándar de glucosa de 1 mg/ml. Se realizó una curva patrón de glucosa específica a concentración molares conocidos (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0) y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro a una longitud de onda 490 nm.

Una vez que se obtuvo la curva patrón se procedió a colocar una muestra de 1 ml en un tubo de ensaye (1 ml de muestra + 150 ml de agua destilada) después se le adicionó 1 ml de fenol a 5 %, y se homogenizó en un vortex, posteriormente se le adicionó 5 ml de ácido sulfúrico concentrado lentamente y con mucho cuidado de no quemarse (reacción exotérmica), se homogenizó nuevamente en vortex, debido a la reacción que se lleva a cabo entre los reactivos se dejó enfriar por un periodo de 15 minutos y se procedió a leer su absorbancia a 490 nm. Se realizó el método por duplicado por cada muestra (DuBois M. *et al.*, 1956).

### II.II.7 Azúcares reductores

Se usó de la técnica de Miller G. (1959) en donde se hace uso del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

Para las diluciones se usó la metodología de Flores A. y Romero L. (2008). Primero se realizó una curva de calibración para la cual se prepara una solución estándar de glucosa de 1 mg/ml. De la solución patrón de glucosa se prepararon diluciones con concentración molares conocidas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0) y se leyó la absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro a una longitud de onda 540 nm.

Una vez que se obtuvo la curva patrón se procedió a colocar una muestra de 1 ml en un tubo de ensaye (1 ml de muestra y 25 ml de agua destilada) después se le adicionó 1 ml de DNS y se homogenizó en vortex, los tubos se sumergieron en un recipiente con agua a ebullición durante 3 minutos, posteriormente los tubos se sacaron para adicionarle 2 ml de agua destilada y agitarlos, se dejaron reposar durante 10 minutos. Seguido se realizó la lectura de su absorbancia 540 nm. Se realizó el método por duplicado por cada muestra.

### II.II.8 Acidez total

Se realizó de acuerdo a la NMX-V-042-1972. Se colocaron 20 ml de muestra en un matraz Erlenmeyer al cual se le agrego 2 ml de solución indicadora de fenolftaleína; la alícuota se tituló con solución de hidróxido de sodio al 0.1 N, hasta que apareció un color rosado permanente. Se realizó el método una vez por cada muestra.

Los cálculos y la expresión de resultados en gramos de ácido láctico por cien mililitros de muestra, se realizaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A.T. = \frac{V * N * 0.090 * 100}{M}$$

*Ecuación 6. Acidez total*

En donde:

A.T. = Acidez total expresada en gramos de ácido láctico por 100 ml de muestra.

V = Mililitros de hidróxido de sodio gastados en la titulación de la muestra

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio usada en la titulación.

0.090 = Miliequivalente del ácido láctico

M = Mililitros de muestra empleados en la determinación

### II.II.9 Viscosidad

Se usó un viscosímetro Cannon-Fenske, el cual se colocó dentro de un vaso de precipitado de 1000 ml que posteriormente se llena a tope con agua destilada, el viscosímetro es sostenido mediante un soporte universal y pinzas para bureta.

Se colocó una muestra de 10 ml en el tubo grueso del viscosímetro. Con una perilla colocada en el tubo delgado se succiona la muestra, esta debe de quedar por encima de la línea superior y a continuación se hace la lectura tomando el tiempo que tarda en recorrer de la línea superior a la línea inferior.

Los cálculos y la expresión de resultados en centiPoise (cP) se realizaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{\rho_1 * t_1}{\rho_2 * t_2}$$

*Ecuación 7. Viscosidad relativa*



En donde:

$\eta_1$  = Viscosidad del agua (0.000955 kg/m\*s)

$\eta_2$  = Viscosidad de la muestra

$\rho_1$  = Densidad del agua

$\rho_2$  = Densidad de la muestra

$t_1$  = Tiempo del agua

$t_2$  = Tiempo de la muestra

Despejando la ecuación 7, se obtiene la ecuación 8:

$$\eta_2 = \frac{\eta_1 * \rho_2 * t_2}{\rho_1 * t_1}$$

*Ecuación 8. Viscosidad de la muestra*

Para obtener la densidad del agua y de la muestra se usó un picnómetro de 10 ml.

#### II.II.10 Proteínas (Método Kjendahl)

Se realizó de acuerdo a la NMX-V-029-1972, Se colocó 100 ml de muestra exactamente medidos en el matraz de Kjendahl y se evaporo casi a sequedad, se añadió 10 g de sulfato de potasio y 20 ml de ácido sulfúrico dejándolo caer por las paredes del recipiente, se agregó 0.5 g de sulfato de cobre, agitándolo con cuidado.

Se colocó el matraz con el embudo en posición inclinada, en la estufa con digestor bajo una campana, calentándolo lentamente durante 20 a 30 minutos, elevando la temperatura poco a poco hasta que la espuma desapareció y empezó la ebullición, se continuó con el calentamiento hasta que se obtuvo una decoloración en la solución de un verde tenue.

Se enfrió teniendo la seguridad de que la oxidación ha sido completa. Se agregó 200 ml de agua y 50 ml de hidróxido de sodio al 50%, quedando una solución fuertemente alcalina y se agregó perlas de vidrio, para evitar el borboteo durante la ebullición.

Se conectó el matraz con la trampa y condensador, colocando en la terminal de éste un matraz que contenga de 50 a 100 ml de ácido clorhídrico 0.1 N con tres gotas de rojo de metilo, donde se almaceno el amoniaco que se desprendió de la muestra. Se continuo con el calentamiento hasta que se pasaron las dos terceras partes de la solución (la punta del condensador debe llegar debajo de la superficie de la solución del ácido clorhídrico para prevenir el escape de amoniaco). Por último, el contenido del matraz receptor se tituló con solución 0.1 N de hidróxido de sodio. Se efectuó una prueba en blanco. Se realizó el método una vez por cada muestra.

Los cálculos y la expresión de resultados en porcentaje se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{(V_1 - V_2) * 1.4 * 6.25}{D * 1000}$$

*Ecuación 9. Proteínas*

En donde:

$V_1$  = ml de hidróxido de sodio 0.1 N gastados en la prueba en blanco.

$V_2$  = ml de hidróxido de sodio 0.1 N gastados en la prueba problema.

1.4 = equivalente del nitrógeno.

6.25 = Factor de las proteínas.

D = Densidad a 20.5 °C

Durante el desarrollo de la metodología, las muestras que se procesaron al inicio de la investigación no dieron los resultados deseados ya que estas se quemaban durante el calentamiento, por lo tanto, se procedió a ajustar la cantidad de las muestras y de las cantidades de las soluciones químicas haciendo un ajuste proporcional a la muestra quedando de la siguiente manera:

- 5 ml de muestra
- 0.5 g de sulfato de potasio
- 1 ml de ácido sulfúrico
- 0.025 g de sulfato de cobre
- 10 ml de agua
- 2.5 ml de hidróxido de sodio al 50%

## II.IV Identificación microbiológica

La muestra que se analizó para el estudio microbiológico fue el pulque almacenado durante siete días a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para este análisis se utilizaron tres medios de cultivo selectivos para identificaciones de posibles microorganismos resistentes a las bajas temperaturas: Agar "All Purpose Tween" (APT), Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y Agar Papa Dextrosa (PDA).

Para conocer qué tipo de microorganismos resistieron a las bajas temperaturas se utilizaron los siguientes dos métodos:

1. Identificación de las cepas aisladas: se realiza la prueba bioquímica de la catalasa y la tinción de Gram para identificar su morfología.
2. Evaluación de la actividad antimicrobiana: se lleva a cabo mediante agentes antimicrobianos.

## II.V Método de descongelación para la identificación microbiológica

El pulque almacenado en ultracongelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) se descongeló a temperatura ambiente.

## II.VI Métodos de análisis para la identificación microbiológica

### II.VI.1. Identificación de las cepas aisladas

- Prueba de la catalasa

Con el asa bacteriológica se tomó una porción de colonia del microorganismo a analizar y se colocó en el portaobjetos distribuyendo uniformemente, posteriormente se agregó una gota de peróxido de hidrogeno y se observó si existiera posible burbujeo, la producción rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.

- Tinción de Gram.

Primero se realizó un frotis del microorganismo, para ello se añadió una gota pequeña de agua destilada al portaobjeto posteriormente se tomó una muestra con el asa bacteriológica (previamente esterilizada) de la placa con las bacterias, se

tomaron unas colonias y se extendieron sobre la gota de agua destilada, una vez extendido se fijó la muestra con calor.

Para realizar las tinciones se utilizó el kit de Hycel Tinción Gram. Una vez fijada la muestra se le aplicó cristal violeta durante un minuto, luego para quitar exceso del reactivo se lavó con agua destilada. A continuación, se añadió lugol durante un minuto, y nuevamente se lavó con agua destilada. Después, se añadió durante 10 a 15 segundos la mezcla de alcohol-acetona (el portaobjeto debe estar de manera inclinada, para evitar una decoloración excesiva) y nuevamente se lavó con agua destilada. Para finalizar, se añadió safranina durante un minuto y se lavó con agua destilada. Las tinciones se observaron en el microscopio.

#### II.VI.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

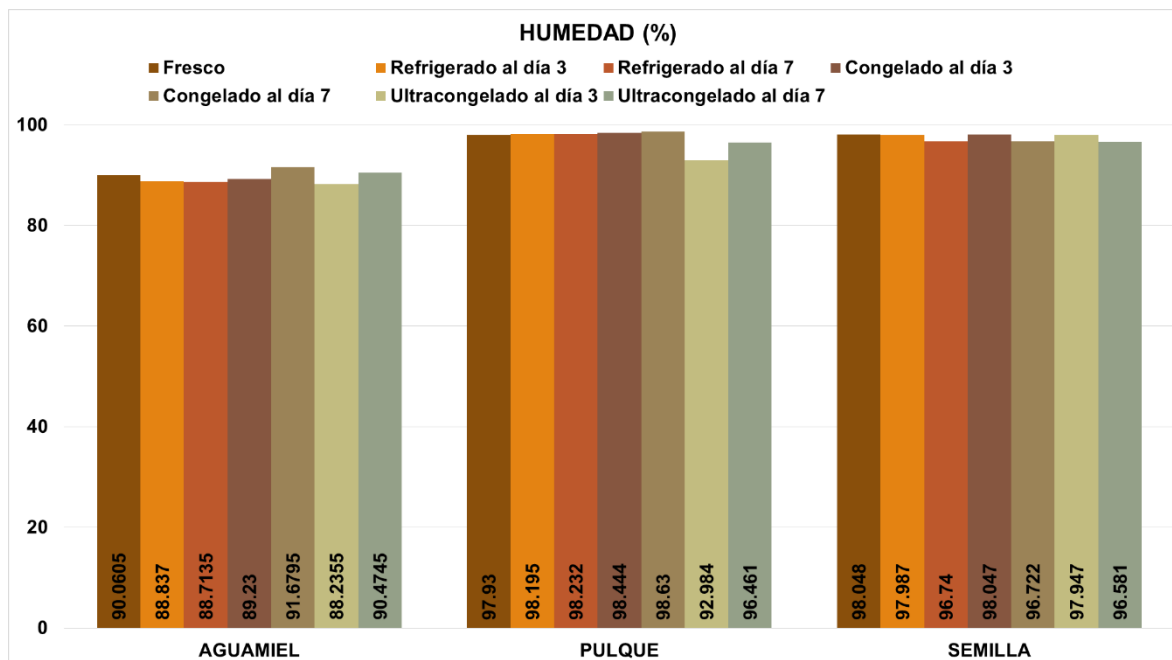
Se utilizaron como cepas indicadoras *Salmonella typhimorium*, *Eschericia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Estas cepas se sembraron por la técnica de difusión en agar. Se tomó 1 ml de una dilución  $10^{-2}$  de cada bacteria patógena para inocular en 20 ml de agar método estándar. En las placas se abrieron pozos donde se depositaron 50  $\mu$ L de un cultivo líquido en caldo MRS de cada una de las bacterias lácticas a evaluar. Las placas se incubaron por 24 h a una temperatura de 35 °C. La actividad antimicrobiana se detecta por la presencia de una zona de inhibición alrededor del pozo. El diámetro de los halos se midió con un vernier.

## Capítulo III. Análisis y discusión de resultados

### Humedad

De acuerdo a Godoy A. *et al.* (2003), la humedad determinada para la semilla fue de 97.71%, este dato se considerará como referencia como el intervalo permitido. En la gráfica 1, se observa que en la muestra fresca, el valor fue de 98.048% que supera el límite permitido, podría ser que el dato obtenido sobrepase debido a consecuencia de diversos factores como el clima (como temporadas de lluvias) o que el productor agregue agua, entre otros.

Analizando los tres métodos de conservación a los siete días, se observó que en los valores de la muestra semilla hubo una disminución de humedad, refrigeración: 96.74%, congelación: 96.722% y ultracongelación: 96.581%, estos valores entran en el intervalo descrito por Godoy A. *et al.* (2003).



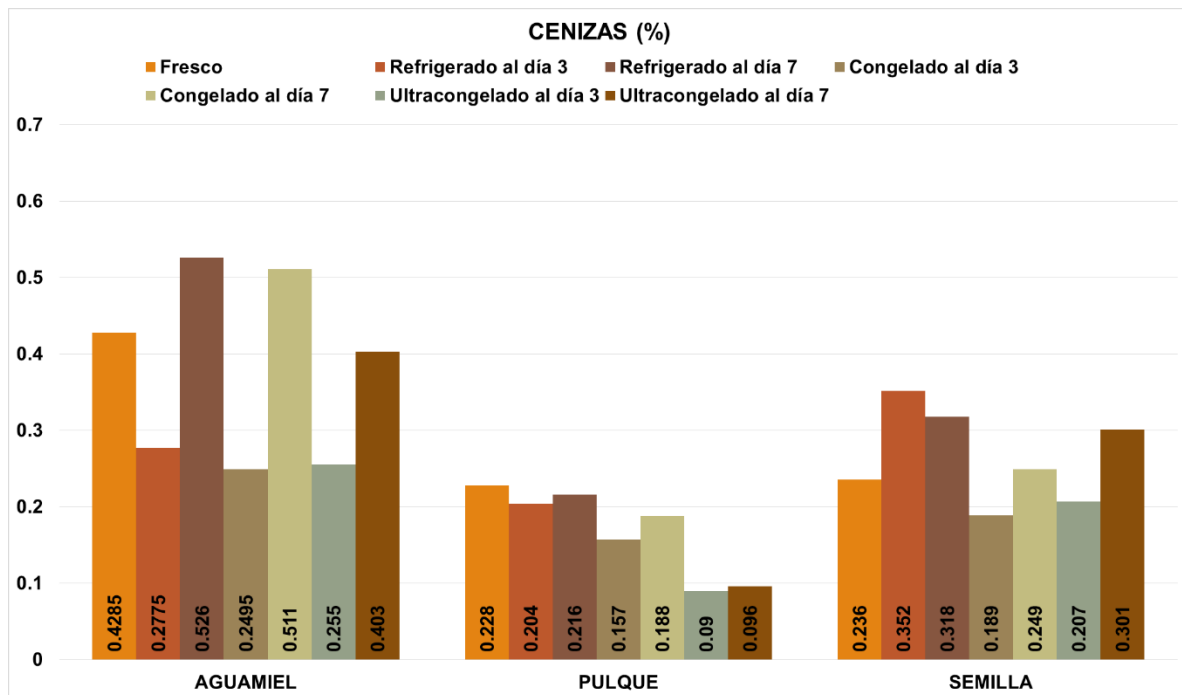
Gráfica 1. Porcentaje de humedad.

De acuerdo a lo encontrado en la literatura, los porcentajes de humedad para el aguamiel son variables: 81.5 %, 87%, 87.38%, 89.61%, 94% y 96% respectivamente a Ramírez M.A. *et al.*, (2001), Flores A. y Romero L. (2008), Bautista N. (2006), Romero M.R. *et al.*, (2015), Godoy A. *et al.* (2003) y Pillajo J. (2015). Para este trabajo se considerará los valores de Ramírez M.A. *et al.*, (2001) y Pillajo J. (2015) quedando como el intervalo permisible. La humedad de la muestra fresca tiene un valor de 90.06%, el cual entra en el intervalo permitido, durante el almacenamiento al día siete en congelación y ultracongelación, mantienen un valor cercano al de la muestra fresca.

Godoy A. *et al.* (2003) reporta una humedad de 97 - 98.3% para pulque, la muestra fresca (97.93 %) entra en los valores reportados, durante el almacenamiento en los tres métodos de conservación al día tres y siete en la refrigeración a pesar que hubo un ligero aumento de humedad se mantienen de acuerdo a lo reportado.

## Cenizas

De acuerdo a Godoy A. *et al.* (2003), el porcentaje de cenizas determinado para la semilla fue de 0.237%, este dato se consideran como referencia como el intervalo permitido. Analizando la gráfica 2, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que solo dos métodos alcanzaron los valores más cercanos a la muestra fresca (0.236%) y mantienen el intervalo permitido, los métodos fueron los siguientes: congelación: a los tres días con un porcentaje de 0.189 así como también al día siete con un porcentaje del 0.249 (sobrepasando el límite máximo por 5.06%), y la ultracongelación: a los tres días con un porcentaje del 0.207, siendo este el mejor método ya que se acerca al valor de la muestra fresca. Aunque se observó que mientras pasan los días el porcentaje de cenizas va en aumento podría ser a consecuencia de la actividad microbiana.



Gráfica 2. Porcentaje de cenizas.

En los intervalos descritos por la norma NMX-V-022-1972 (en porcentajes 0.3 - 0.43) para el aguamiel, el valor de la muestra fresca queda dentro de estos (0.4285 %), al día tres hubo una disminución en los tres métodos quedando así por debajo del límite mínimo. Al día siete, durante la refrigeración y la congelación hubo un aumento quedando fuera del límite máximo, mientras que durante la

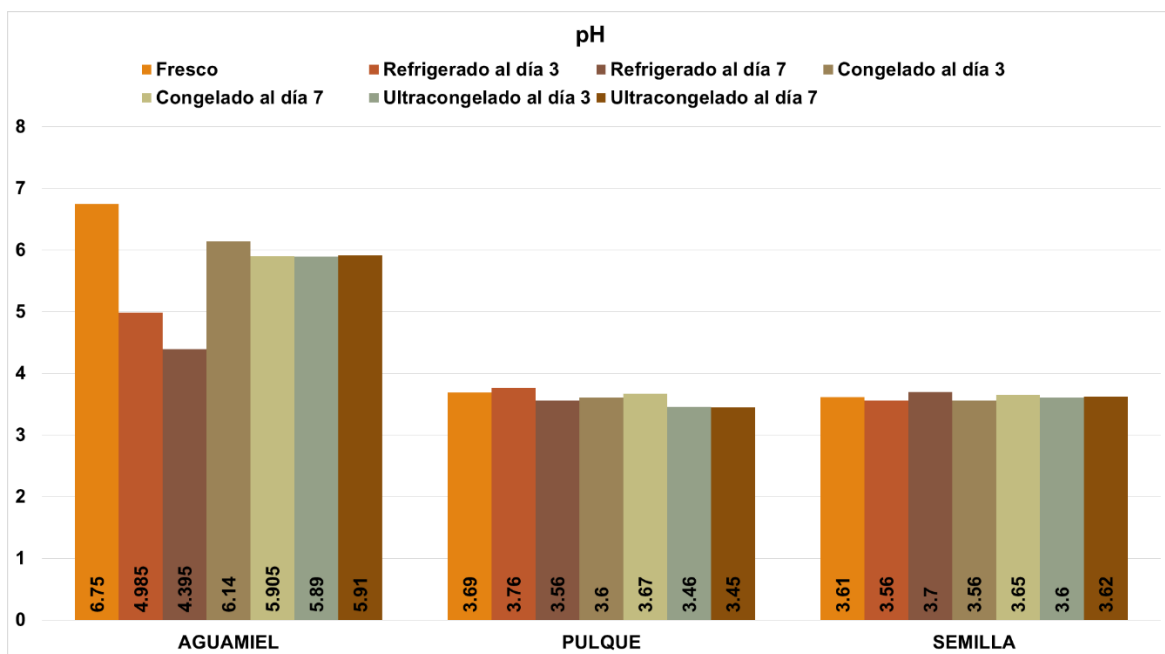
ultracongelación al día siete se mantiene dentro del intervalo de la norma, aunque es menor el valor con respecto a la muestra fresca.

El porcentaje de cenizas reportado por Godoy A. *et al.* (2003) (0.2 y 0.312 %) y Medina C. *et al.* (2022) (0.36 %), indica que la muestra fresca (0.228 %) y al día tres durante la refrigeración están dentro de los valores reportados, mientras que en la congelación y ultracongelación al día tres y siete se muestra una disminución considerable de porcentaje de cenizas.

## pH

De acuerdo a la NMX-V-037-1972, el intervalo permitido para la semilla de pH son de 3.7 - 4.2. Analizando la gráfica 3, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que el valor del pH durante la refrigeración aumento en el día siete, pH del 3.7 (comparado con el valor de la muestra fresca pH=3.61) alcanzando entrar en el intervalo permitido por la norma. Mientras que durante la congelación al día siete se obtuvo un pH del 3.65 y en la ultracongelación al día tres y siete se obtuvo un pH del 3.6 y 3.62 respectivamente. Estos últimos datos mencionados serán los que se tomaran como aceptables y no el valor de la refrigeración al día siete, porque mientras el tiempo transcurre el pH ira aumentan de manera más rápida que los anteriores de congelación y ultracongelación.

Este efecto podría deberse a dos razones, una que la bebida presenta poca carga microbiana la que le permite dar acidificación a la bebida y otra es que durante la descongelación se tomó enseguida el valor de la muestra y no se le dio el tiempo necesario a la carga microbiana para poder activarse e iniciar con la actividad de acidificación.



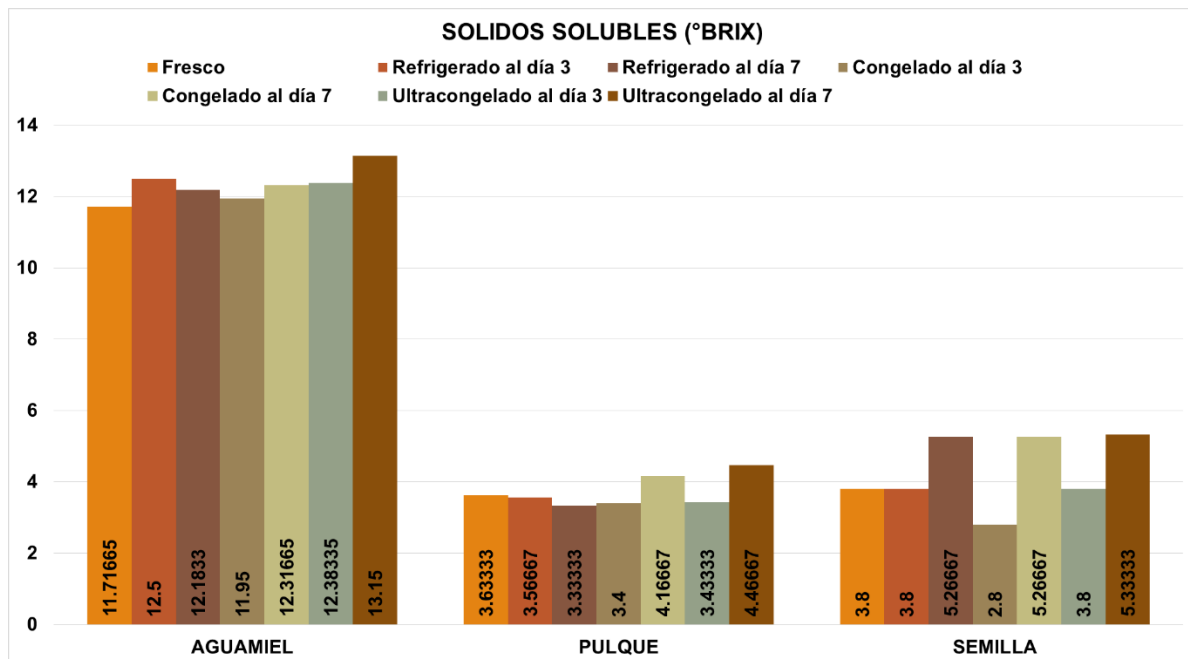
Gráfica 3. Valores de pH.

En la norma NMX-V-022-1972 indica el intervalo de (6.6 - 7.5) para el aguamiel, en la muestra fresca se obtuvo 6.75 que entra en el intervalo establecido, el único dato que se mantienen cerca del valor de la muestra fresca es al día tres en congelación, pero queda por debajo del límite mínimo, los demás valores obtenidos durante el día tres y siete durante el almacenamiento quedan por debajo del mínimo, pero la disminución es más notable durante el día tres y siete en la refrigeración.

En el pulque la norma NMX-V-037-1972, indica los siguientes intervalos para el pH (3.7 - 4.2), tanto como en la muestra fresca (3.6) y al día tres y siete en congelación, queda significativamente por debajo del límite mínimo, el único valor que se mantiene dentro del intervalo es al día tres en la refrigeración.

### Sólidos solubles (°Brix)

Álvarez G. *et al.* (2020), obtuvieron para sólidos solubles (°Brix) 5.42 y 5.47, y Medina C. *et al.* (2022) obtuvieron 6 °Brix, ambos para la semilla, estos datos se consideran como referencia como el intervalo permitido. Analizando la gráfica 4, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que los valores se mantienen dentro del intervalo permitido. El valor de la muestra fresca es de 3.8 °Brix, se observa que la refrigeración y la ultracongelación al día tres, mantienen el valor de °Brix de la muestra fresca, mientras que al día siete para los tres métodos aumenta los °Brix, casi alcanzando el valor de los °Brix que se deberían tener, refrigeración: 5.26 °Brix, congelación: 5.26 °Brix y ultracongelación: 5.33 °Brix. Los cuáles serán tomados como los valores aceptables.



Gráfica 4. Sólidos solubles en °Brix.

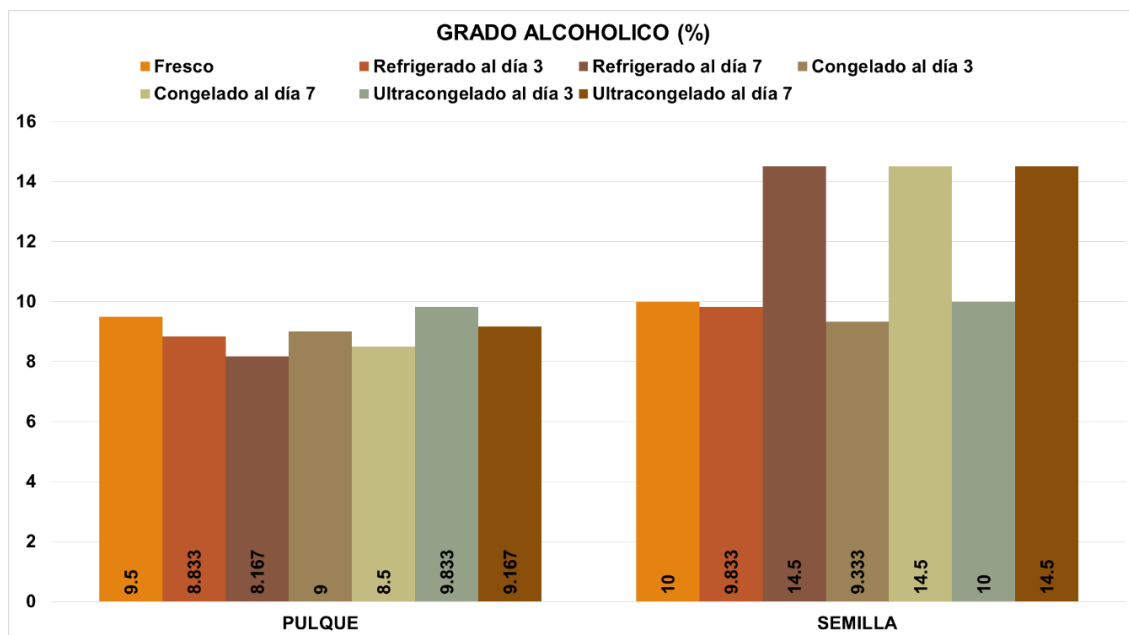


En la literatura se encontraron los siguientes datos para el aguamiel: 9.57 y 9.8 °Brix, 10°Brix, 11.44°Brix y 15.57°Brix respectivamente a Álvarez G. *et al.* (2020), Medina C. *et al.* (2022), Flores A. y Romero L. (2008) y Espíndola V. *et al.*, (2018), el intervalo que se aceptará como permisible será el de Álvarez G. *et al.* (2020) y Espíndola V. *et al.*, (2018). El valor de la muestra fresca es de 11.71 °Brix, que entra en el intervalo permitido, durante el almacenamiento con respecto al dato de la muestra fresca los °Brix fueron aumentando sin sobrepasar el límite máximo, el único valor que se mantiene cerca de la muestra fresca es al día tres durante la congelación.

Se encontró en la literatura una variación en °Brix para el pulque, se reporta lo siguiente: 3.2 °Brix, 4,3°Brix y (7.48 y 8.22 °Brix) respectivamente a Palafox L. (2017), Medina C. *et al.* (2022) y Álvarez G. *et al.* (2020). En los valores obtenidos durante el periodo de tres a siete días en los tres métodos de conservación aplicados como en la muestra fresca (3.63°Brix), entran en los datos reportados. El único valor que se mantiene cerca de la muestra fresca es al día tres durante la refrigeración.

### Grado alcohólico

De acuerdo a la NMX-V-037-1972, el intervalo permitido para la semilla de grado alcohólico son 6 como mínimo y 9 como máximo en v/v%. En la gráfica 5, se observó que todos los valores sobrepasan el límite máximo, incluso el de la muestra fresca (10 v/v%). También se observó que durante el periodo del día tres hasta el día siete, fue aumentando el grado de alcohol. Esto se debe a que las levaduras están transformando los azúcares en etanol. Por lo tanto, no se tomará ningún valor como aceptable.



Gráfica 5. Grado alcohólico en v/v%.

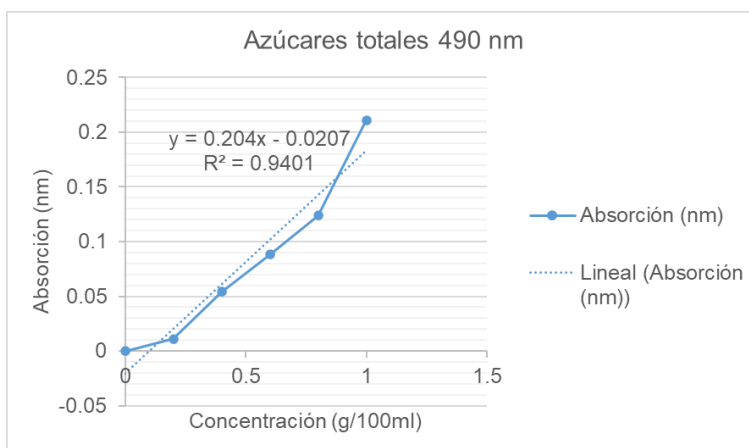
De acuerdo a la norma para el pulque NMX-V-037-1972 nos indica un intervalo de 6 a 9 % de alcohol, en datos obtenidos observamos que en la muestra fresca (9.5%), al día tres en la congelación y ultracongelación, y al día siete en la ultracongelación sobrepasa el límite máximo. Mientras que al día tres en la refrigeración y al día siete en la refrigeración y congelación hubo una disminución en el porcentaje de alcohol de acuerdo a la muestra fresca que permitió que entrara en el intervalo permisible.

### Azúcares totales

Se realizó la curva de calibración para determinar la concentración de azúcares totales en las muestras, y cuantificar los azúcares presentes durante el proceso de conservación. Para obtener la concentración de los azúcares se realizó una interpolación de acuerdo a la tabla 14 y las lecturas de absorbancia obtenidas.

Tabla 14. Azúcares totales 490 nm.

Azúcares totales 490 nm	
Concentración (g/100ml)	Absorción (nm)
blanco	0
0.2	0.011
0.4	0.054
0.6	0.088
0.8	0.124
1	0.211



Gráfica 6. Curva de calibración - azúcares totales.

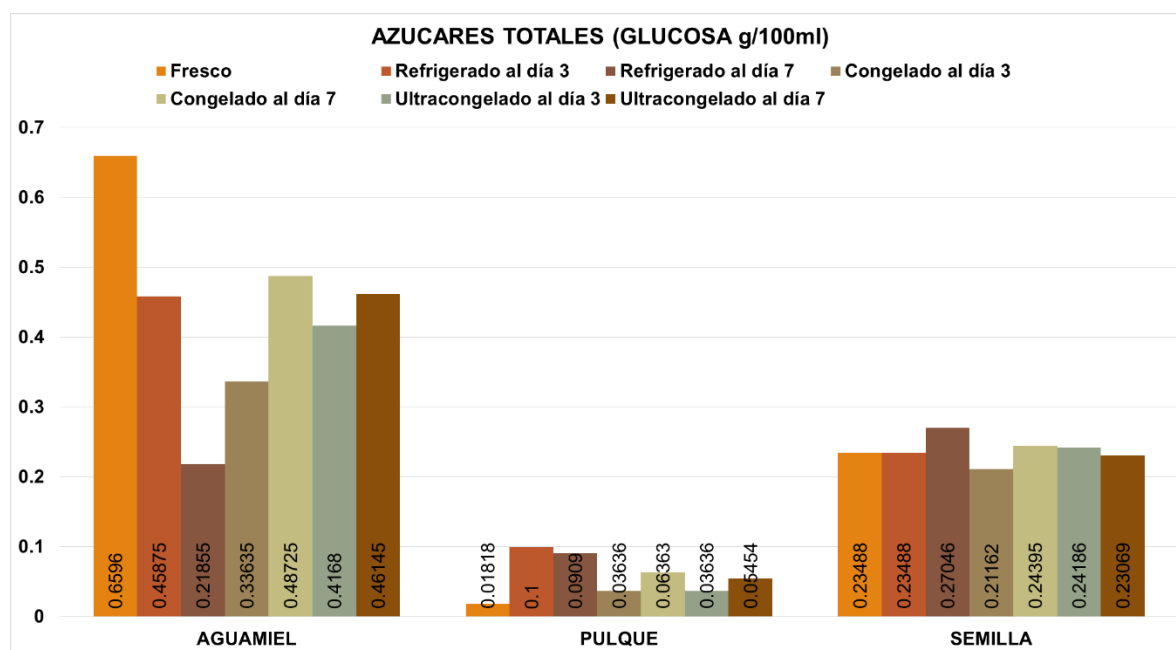
De acuerdo a la NMX-V-037-1972, el intervalo permitido para la semilla de los azúcares totales son 0.10 (glucosa g/100ml) como mínimo y 0.80 (glucosa g/100ml) como máximo. En la gráfica 7, se observó que los valores se mantienen dentro del intervalo permitido después de almacenarlos a bajas temperaturas.

- Refrigeración: al día tres con un valor de 0.2348 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.27046 (glucosa g/100ml).

- Congelación: al día tres con un valor de 0.21162 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.24395 (glucosa g/100ml).
- Ultracongelación: al día tres con un valor de 0.24186 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.23069 (glucosa g/100ml).

Al comparar los anteriores parámetros con la muestra fresca (0.2348 glucosa g/100ml), el método que mantienen un valor similar a la muestra fresca es ultracongelación al día siete.

No se tomará el valor de la refrigeración como aceptable a pesar que mantiene el valor de la muestra en fresco, porque durante la refrigeración aún existe un desarrollo de crecimiento microbiano lo cual es gradual y con el tiempo el valor será mayor.



Gráfica 7. Azúcares totales (glucosa) en g/100ml.

Se observó que los valores obtenidos son mínimos a comparación con la norma NMX-V-022-1972 para el aguamiel y en la literatura, no son aceptables. En la literatura se encontró que Flores A. y Romero L. (2008) obtuvieron (0.865 glucosa g/100 ml), Ramirez A. (2010) (3.213 glucosa g/100 ml) y Espíndola V. *et al.*, (2018) obtuvieron (10.94 glucosa g/100 ml).

Para los azúcares totales la norma NMX-V-037-1972 nos indica el siguiente intervalo (0.10 - 0.80 (glucosa) g/100 ml) para el pulque, en la muestra fresca obtuvimos 0.01818 (glucosa) g/100 ml, la cual está por debajo del límite mínimo, pero se observa que los azúcares totales van aumentando con respecto al tiempo, los aumentos más considerables son al día tres (que están justo al límite mínimo de acuerdo a la norma) y siete durante la refrigeración.

## Azúcares reductores

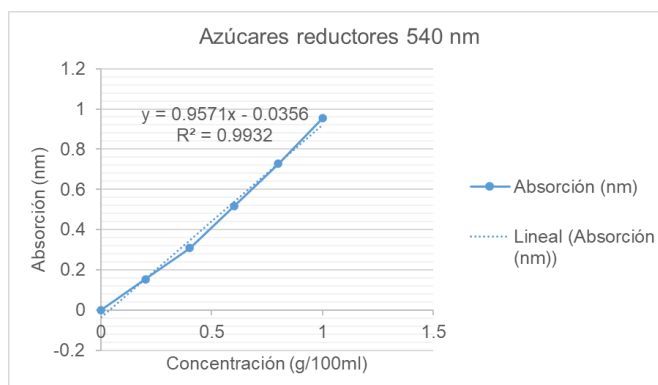
En la norma NMX-V-037-1972, no se consideran los parámetros permisibles de azúcares reductores. En las referencias consultadas, los datos de los azúcares reductores son casi nulos para el pulque por ejemplo Godoy A. *et al.* (2003) observaron que tiene un máximo del 0.02 g/100ml, mínimo del 0.00 g/100ml y un promedio de “huellas”, no hay investigaciones sobre la detención de azúcares reductores para la semilla, por lo tanto, se hará la comparación con pulque comercial. Sepulveda L. (2020) obtuvo para el pulque en estación del invierno un promedio de 2.85 g/L (0.285 g/100ml) de azúcares reductores.

Los datos que se usarán como valores aceptables para este trabajo serán el máximo de 0.02 g/100ml de Godoy A. *et al.* (2003) siendo el límite mínimo y el promedio de Sepulveda L. (2020) 0.285 g/100ml siendo el límite máximo.

Al igual que en los azúcares totales, se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras, y cuantificar los azúcares presentes durante el proceso de conservación. Para obtener la concentración de los azúcares se realizó una interpolación de acuerdo a la tabla 15 y las lecturas de absorbancia obtenidas.

Tabla 15. Azúcares totales 540 nm.

Azúcares reductores 540 nm	
Concentración (g/100ml)	Absorción (nm)
blanco	0
0.2	0.153
0.4	0.308
0.6	0.516
0.8	0.727
1	0.954

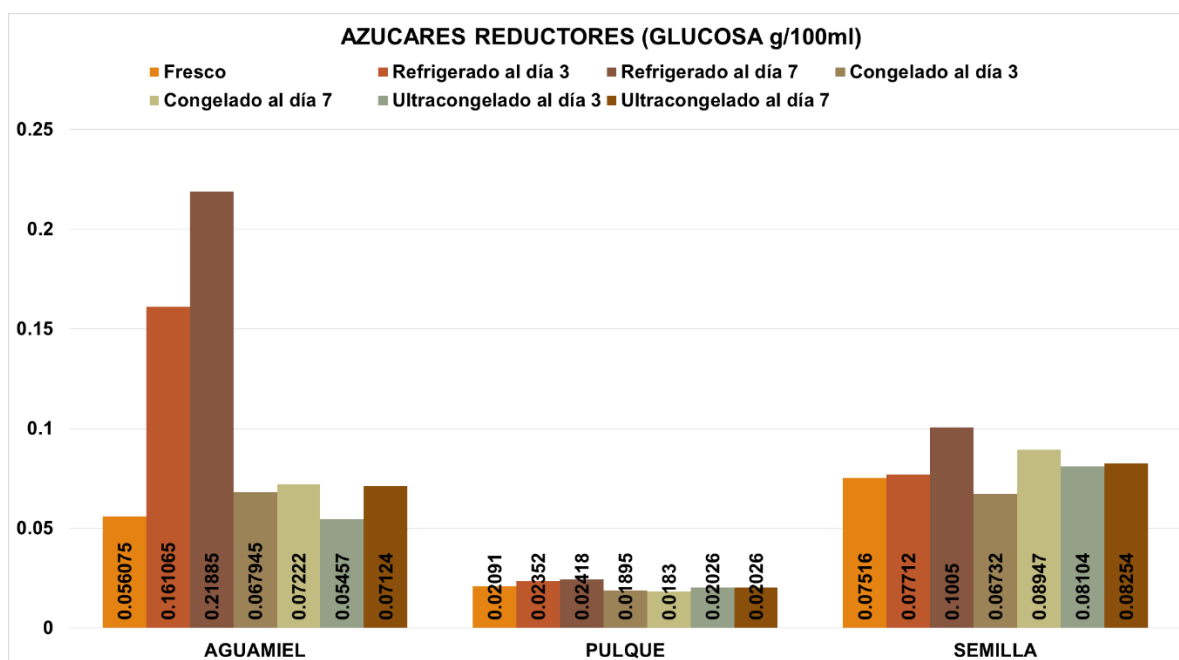


Gráfica 8. Curva de calibración - azúcares reductores.

Analizando la gráfica 9, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que los valores se mantienen dentro del intervalo reportado.

- Refrigeración: al día tres con un valor de 0.07712 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.1005 (glucosa g/100ml).
- Congelación: al día tres con un valor de 0.06732 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.08947 (glucosa g/100ml).
- Ultracongelación: al día tres con un valor de 0.08104 (glucosa g/100ml) y al día siete con un valor de 0.08254 (glucosa g/100ml).

Al comparar los anteriores parámetros con la muestra fresca (0.07516 glucosa g/100ml), se observa que hay un aumento en los parámetros obtenidos, pero serán considerados esos ya que son los más cercanos al valor reportado al límite máximo que son al día siete en los tres métodos.



Gráfica 9. Azúcares reductores (glucosa) en g/100ml.

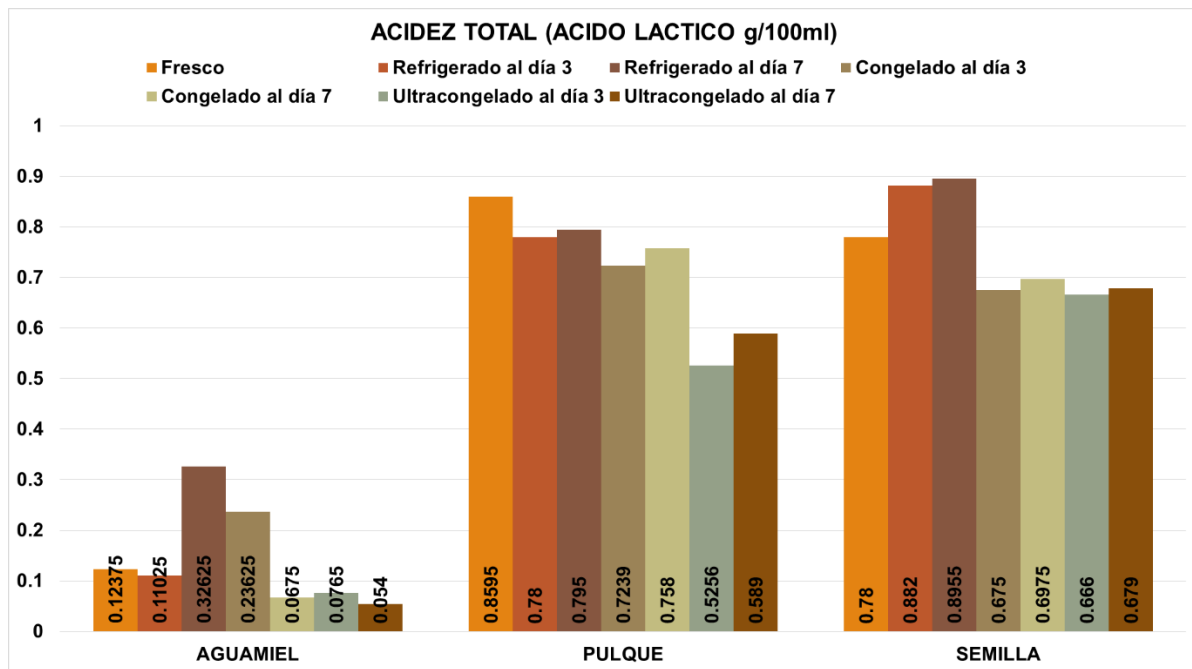
Los valores obtenidos durante el desarrollo de conservación, son mínimos a comparación con la norma NMX-V-022-1972 para el aguamiel, así como en la literatura no son aceptables. En la literatura se encontró que Mena A. (2013) obtuvo (0.3375 glucosa g/100ml), Ramirez A. (2010) obtuvo (1.6 glucosa g/100ml) y Cervantes M. y Pedroza A. (2007) obtuvo (2.5 glucosa g/100ml).

En la literatura se encontraron los siguientes datos para los azúcares reductores en pulque, Godoy A. *et al.* (2003) obtuvieron 0.02 (glucosa g/100 ml) y Cervantes M. y Pedroza A. (2007) obtuvieron 0.476 (glucosa g/100 ml), en la muestra fresca se obtuvo 0.02091 (glucosa g/100 ml) que entra en los datos reportados, durante el día tres y siete en la congelación se observó una disminución notable de esta propiedad.

## Acidez total

De acuerdo a la NMX-V-037-1972, el intervalo permitido para la semilla de acidez total son de 0.4 g/100ml como mínimo y 0.75 g/100ml como máximo, a comparación a lo indicado por la norma, la muestra fresca, tiene un valor de 0.78 g/100ml, que sobrepasa el límite máximo. Analizando la gráfica 10, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que los datos son los siguientes: durante la refrigeración el valor fue aumentando con el tiempo quedando fuera del límite máximo de la norma, en la congelación: a los tres y siete días entran en el intervalo establecido por la norma con los siguientes valores 0.675 g/100ml y 0.6975 g/100ml respectivamente y en la ultracongelación: a los tres y siete días entran en el intervalo establecido por la norma con los siguientes valores 0.666 g/100ml y 0.679 g/100ml respectivamente. Los valores considerados como aceptables serán al día siete en congelación y ultracongelación ya que son valores un poco cercanos al límite máximo.

Se observó que después del almacenamiento a bajas temperaturas disminuye a valores que entran en el intervalo permitido por la norma. Además, no hay un cambio significativo entre los días tres y siete.



Gráfica 10. Acidez total (ácido láctico) en g/100ml.

En el agumiel se observó que los valores obtenidos son mayores a comparación a lo que indica la norma NMX-V-022-1972, pero en la literatura se reportaron los siguientes valores: 0.00164 g/100ml, 0.23 - 0.53 g/100ml y 1.74 g/100ml respectivamente a Medina C. *et al.* (2022), Álvarez G. *et al.* (2020) y Ramírez A. (2010), por lo tanto, si consideramos como límite el mínimo de Medina C. (0.00164 g/100ml) y como el máximo de Álvarez G. (0.53 g/100ml), los valores obtenidos

están dentro de este intervalo. El único dato que se mantienen cerca al valor de la muestra fresca (0.12375 g/100ml) es al día tres durante la refrigeración. Los datos reportados en la literatura como los obtenidos en esta investigación tienen una variación con respecto a la norma esto podría deberse a varios factores como: la especie de maguey, la temporada de recolección, el tipo de suelo, además de que la norma no ha tenido actualizaciones desde el año que entro en vigencia.

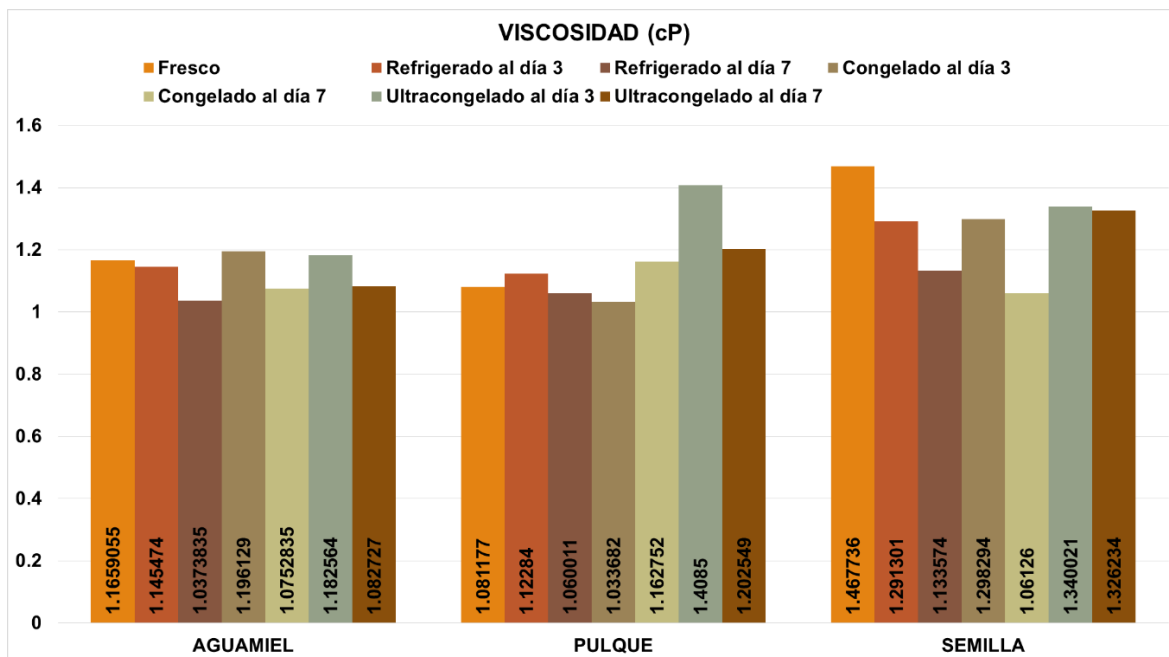
El intervalo permitido para la acidez total en pulque de acuerdo a la norma NMX-V-037-1972 es de 0.4 - 0.75 (ácido láctico) g/100 ml, en la muestra fresca se obtuvo 0.8595 (ácido láctico) g/100 ml, sobrepasando el límite máximo, hubo una disminución de acidez total al día tres y siete en la congelación y ultracongelación que permitió entrar en el intervalo establecido por la norma.

### **Viscosidad**

De acuerdo a Álvarez G. *et al.* (2020), obtuvieron para semilla una viscosidad de 2.48 cP y 2.92 cP, estos valores se consideran como referencia como el intervalo permitido. Analizando la gráfica 11, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que los valores se mantienen dentro de lo permitido. Al comparar los parámetros obtenidos con la muestra fresca de semilla (1.4677cP), se observa que durante el almacenamiento hubo una ligera disminución en los valores en los tres métodos de conservación.

- Refrigeración: al día tres con 1.2913 cP y al día siete con 1.1335 cP
- Congelación: al día tres con 1.2982 cP y al día siete con 1.0612 cP
- Ultracongelación: al día tres con 1.34 cP y al día siete con 1.3262 cP

El método que alcanza un valor similar a la muestra fresca es la ultracongelación en el día tres y siete.



Gráfica 11. Viscosidad en cP.

De acuerdo a Álvarez G. *et al.* (2020), se observó que todos los datos obtenidos para el aguamiel, se quedan significativamente por debajo del mínimo por lo reportado en la literatura que fue 1.22 y 1.3 cP.

En la literatura para la viscosidad del pulque, Godoy A. *et al.* (2003) reportaron 1.2 - 3.5 cP, y Álvarez G. *et al.* (2020) reportaron 1.48 y 1.59 cP los cuales están dentro del intervalo de datos reportados por Godoy A. Para la muestra fresca se obtuvo 1.0811 cP queda por debajo del mínimo de acuerdo a los valores descritos anteriormente, mientras que al día tres y siete en la ultracongelación entran quedando sobre el límite mínimo, esto a causa de que hubo un aumento de viscosidad.

### Proteínas (método Kjendahl) (%)

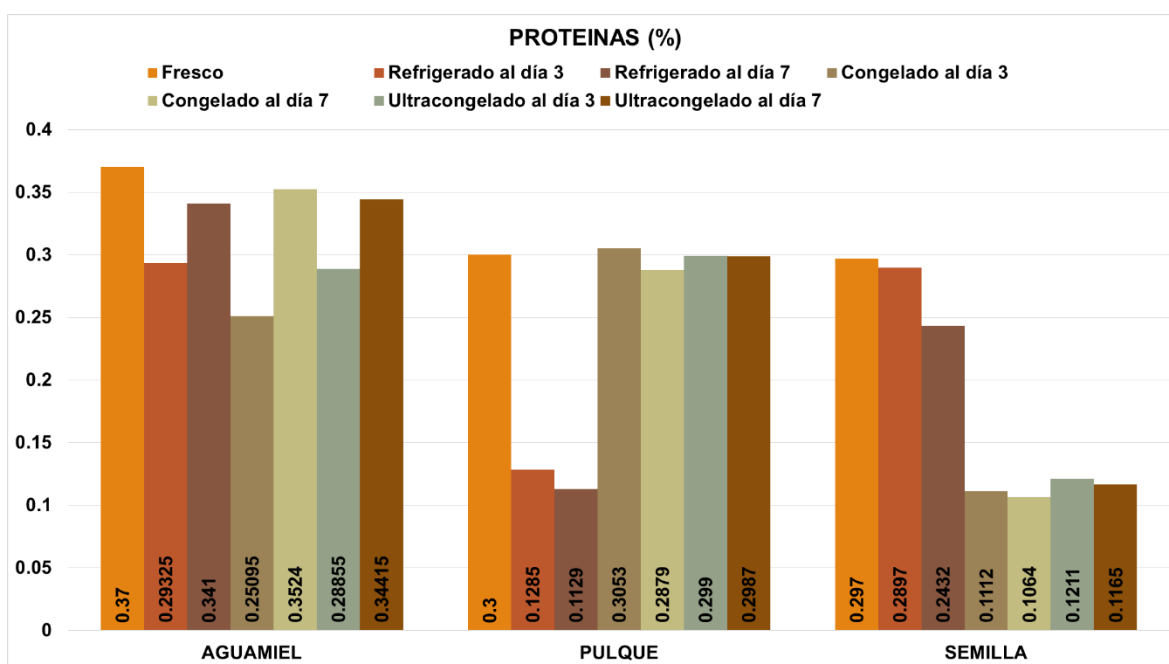
De acuerdo a los siguientes autores, Cervantes M. y Pedroza A. (2007) obtuvieron 1g/L (1g/1000ml) y Godoy A. *et al.* (2003) obtuvieron 0.29 g/100ml, ambos de proteína para la semilla. Estos valores fueron convertidos a porcentajes quedando así un intervalo permitido de 0.000103 a 0.298%. Analizando la gráfica 12, en los tres métodos de conservación aplicados se observó que los valores de semilla se mantienen dentro del intervalo permitido.

- Refrigeración: día tres y siete con valor de 0.2897% y 0.2432% respectivamente
- Congelación: día tres y siete con valor de 0.1112% y 0.1064% respectivamente



- Ultracongelación: día tres y siete con valor de 0.1211% y 0.1166% respectivamente

Al comparar los anteriores parámetros con la muestra fresca de semilla (0.297%), el método que alcanza un valor similar a la muestra fresca es la refrigeración en el día tres, no se esperaba que durante la refrigeración se mantuviera el porcentaje de proteínas. Porque sabemos que las muestras inicialmente tienen un porcentaje de proteína mayor, el cual va disminuyendo conforme avanza el tiempo de fermentación, esto se debe a que los microorganismos, consumen las proteínas aumentando la biomasa, por lo tanto, queda descartado el método de refrigeración ya que no puede mantener valores similares a la muestra fresca. Entonces el método aceptable es la ultracongelación durante a los días tres y siete.



Gráfica 12. Porcentaje de proteínas.

En el intervalo descrito por la norma NMX-V-022-1972 para el aguamiel (en porcentajes 0.3 - 0.6), el valor de la muestra fresca (0.37%) entra en el intervalo permitido, mientras que al día tres en los tres métodos de conservación quedan por debajo del mínimo, y al día siete en los tres métodos de conservación hubo una disminución con respecto al valor de la muestra fresca, pero están dentro del intervalo permitido.

En la literatura los valores de las proteínas en pulque, se reportó lo siguiente: 0.1 % (Cervantes M. y Pedroza A., 2007), 0.33% (Medina C. *et al.*, 2022) y 0.5026% (Godoy A. *et al.*, 2003), en la muestra fresca se obtuvo un valor de 0.3%, el valor está dentro de los datos reportados. Aunque hubo una significativa disminución de porcentaje de proteínas con respecto al valor de la muestra siguen estando de los parámetros permisibles.

Durante el almacenamiento a bajas temperatura se observó los siguientes puntos en la muestra de semilla acorde a las propiedades fisicoquímicas consideradas para su estudio mostrados en la tabla 16.

1. Se encontró que en la mayoría de las propiedades fisicoquímicas hay variaciones en los valores obtenidos después de analizar las muestras conservadas con respecto a la muestra en fresco, esto puede ser a causa de factores como: una descongelación mal efectuada, la falta de repeticiones en las mediciones en cada muestra, la incorrecta manipulación de la muestra y el tiempo que tarda en llegar al punto de temperatura de refrigeración, congelación y ultracongelación.
2. Así como también que las propiedades fisicoquímicas como pH, grado alcohólico, azúcares totales y acidez total, tres propiedades de las cuatro mencionadas anteriormente no cumplen con los aspectos de la norma, esto puede ser a causa a varios factores como: el tiempo y temporada de elaboración, el clima, la incorrecta manipulación por parte del tlachiquero, la cantidad de carga microbiana de la muestra, entre otras.

Mientras que las propiedades fisicoquímicas como humedad, cenizas, sólidos solubles (°Brix), azúcares reductores, viscosidad y proteínas, cinco propiedades de las seis mencionadas anteriormente cumplen con lo citado en la literatura, realmente los datos consultados son pocos debido a la poca investigación que hay de las propiedades fisicoquímicas para la semilla, dando a lugar que en su mayoría los valores encontrados sean aceptables.

Tabla 16. Aspectos considerados durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

<b>Propiedades fisicoquímicas / Aspectos considerados durante el almacenamiento</b>	<b>1. Se mantuvieron sin cambios significativos durante el tiempo de almacenamiento con respecto a la muestra en fresco.</b>	<b>2. La muestra en fresco coincide con los valores reportados en la literatura o en la norma.</b>
Humedad	No, hubo una disminución con respecto al valor de la muestra fresca, excepto al día tres en congelación, se mantiene.	No, sobrepasa el límite máximo
Cenizas	No, hubo una disminución al día tres en congelación y ultracongelación. Y un aumento al día tres en refrigeración y al día siete en los tres métodos.	Si
pH	No, hubo un aumento al día tres en ultracongelación y al día siete en los tres métodos, pero hubo una disminución al día tres en refrigeración y congelación.	No, está por debajo del límite mínimo
Sólidos solubles (°Brix)	No, hubo disminución durante la congelación al día tres; pero al siete día si hubo un aumento en los tres métodos.	Si
Grado alcohólico	No, hubo un aumento en los tres métodos al día tres y siete.	No, sobrepasa el límite máximo
Azúcares totales	Hubo cambios significativos, pero se mantienen cerca del valor de la muestra fresca	Si
Azúcares reductores	Hubo cambios significativos, pero se mantienen cerca del valor de la muestra fresca a excepción del día siete en la refrigeración.	Si
Acidez total	No, hubo un aumento al día tres y siete en la refrigeración, pero hubo una disminución al día tres y siete tanto en congelación y ultracongelación.	No, sobrepasa el límite máximo
Viscosidad	No, hubo una disminución al día tres y siete en los tres métodos.	Si
Proteínas	No, hubo una disminución al día tres y siete en los tres métodos.	Si

La tabla 17 muestra los métodos de conservación a bajas temperaturas que mantienen las características de la semilla dentro de los valores aceptables de acuerdo a las normas y a los valores de referencia reportados en la literatura, así como también el método que mantiene el valor inicial de la muestra fresca después de su conservación.

*Tabla 17. Resumen de los métodos de conservación a bajas temperaturas con valores aceptables.*

<b>Propiedades físicoquímicas/ Métodos de conservación</b>	<b>Refrigerado</b>		<b>Congelado</b>		<b>Ultracongelado</b>	
	<b>Día 3</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 7</b>
Humedad		✓		✓		✓
Cenizas					✓	
pH				✓	✓	✓
Sólidos solubles (°Brix)		✓		✓		✓
Grado alcohólico						
Azúcares totales						✓
Azúcares reductores		✓		✓		✓
Acidez total				✓		✓
Viscosidad					✓	✓
Proteínas					✓	✓

El método menos recomendable para conservar la semilla es el de refrigeración, solo mantuvo tres de diez propiedades físicoquímicas durante el periodo de siete días, que fue la humedad, sólidos solubles (°Brix) y azúcares reductores, las cuales no están dentro de la norma para determinar la calidad, pero se utilizó datos de comparación encontrados en la literatura, los cuales varen de acuerdo a las especies de maguey o de la región.

En los tres métodos de conservación (refrigeración, congelación y ultracongelación), durante el periodo de los siete días, solo se mantuvieron tres propiedades físicoquímicas estables: humedad, sólidos solubles (°Brix) y azúcares reductores para la semilla.

En la tabla 18 se muestra la comparación de los valores obtenidos durante la ultracongelación al día siete para la semilla contra parámetros con criterio de límites permitidos, para las siguientes propiedades físicoquímicas los datos fueron tomados de otras investigaciones ya que los valores aceptables de humedad, cenizas, sólidos solubles (°Brix), azúcares totales, viscosidad y porcentaje de proteínas como se muestran, aún no son legalizados en la actualidad en las Normas Oficiales Mexicanas (véase I.I.4 Especificaciones de normatividad).

Tabla 18. Comparación de parámetros descritos por la normatividad y literatura contra los valores obtenidos para la semilla.

Propiedad fisicoquímica	Límites permitidos	Valores obtenidos
Humedad	(0 - 97.71 %) <sup>1</sup>	96.581 %
Cenizas	(0 - 0.237 %) <sup>1</sup>	0.207 %
pH	(3.7 - 4.2) <sup>2</sup>	3.62
Sólidos solubles (°Brix)	0 – (5.42 y 5.47) <sup>3</sup> y 6 <sup>4</sup> (°Brix)	5.33 °Brix
Grado alcohólico	(6 - 9 v/v%) <sup>2</sup>	14.5 v/v%
Azúcares totales	(0.10 - 0.80 glucosa g/100ml) <sup>2</sup>	0.23069 glucosa g/100ml
Azúcares reductores	0.02 <sup>1</sup> - 0.285 <sup>5</sup> (glucosa g/100ml)	0.08254 glucosa g/100ml
Acidez total	(0.4 - 0.75 ácido láctico g/100ml) <sup>2</sup>	0.679 ácido láctico g/100ml
Viscosidad	0 – (2.48 y 2.92) <sup>3</sup> (cP)	1.3262 cP
Proteínas	0.000103 <sup>6</sup> - 0.298 <sup>1</sup> (%)	0.1166 %

Fuentes: <sup>1</sup>Godoy A. *et al.* (2003), <sup>2</sup>NMX-V-037-1972, <sup>3</sup>Álvarez G. *et al.* (2020), <sup>4</sup>Medina C. *et al.* (2022), <sup>5</sup>Sepulveda L. (2020), <sup>6</sup>Cervantes M. y Pedroza A. (2007).

Solo dos propiedades de diez no cumplen los parámetros permitidos de calidad, una de ellas es el grado alcohólico, principalmente esta propiedad su porcentaje de etanol sirve como un índice de calidad de acuerdo a NMX-V-037-1972. En el aguamiel no se realizó una prueba de alcohol, pero se deduce que en el aguamiel existía una carga alta de bacterias productoras de etanol, porque se observó que en el pulque fresco y conservado por el mismo método y periodo mostró un porcentaje de alcohol alto, lo cual podría indicar el aumento de alcohol en la semilla progresivamente durante su conservación.

#### **Análisis microbiológico de pulque crioconservado a -80°C.**

Se cultivó en medios selectivos (agar MRS, APT y PDA) a una temperatura de 35°C por 72 h. Únicamente hubo crecimiento en las cajas con agar MRS y APT. Las cajas de PDA se incubaron por siete días y no hubo crecimiento como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Crecimiento de microorganismos a 35°C a partir de pulque almacenado a -80°C.

Cultivo / Dilución	MRS	APT	PDA
10 <sup>-1</sup>	12	7	0
10 <sup>-2</sup>	3	1	0
10 <sup>-3</sup>	0	1	0

En total se aislaron 24 cepas en los medios selectivos.

#### 1. Identificación de cepas aisladas

Se analizaron las 24 cepas aisladas y como criterio de selección primaria se consideró la morfología colonial, eligiendo aquellas que no presentaran características típicas de levaduras, de una coloración blanca a cremosa y un tamaño de 1 a 3 mm de diámetro, con forma plana o convexas. Se seleccionaron para este trabajo nueve cepas con características correspondientes a bacterias lácticas (BL<sub>Apan</sub>): catalasa negativa, tinción de Gram positivo con forma bacilar, como se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Bacterias lácticas aisladas de pulque artesanal almacenado a bajas temperaturas.

Medio	T. incubación	Fuente	Catalasa	Tinción Gram	Morfología a 100X	Nomenclatura
APT	30°C	Pulque -80°C	-	+	bacilos cortos, forman agrupaciones	BL <sub>Apan</sub> 1
						BL <sub>Apan</sub> 2
						BL <sub>Apan</sub> 3
MRS	30°C	Pulque -80°C	-	+	bacilos cortos, forman agrupaciones	BL <sub>Apan</sub> 4
						BL <sub>Apan</sub> 5
						BL <sub>Apan</sub> 6
						BL <sub>Apan</sub> 7
						BL <sub>Apan</sub> 8
						BL <sub>Apan</sub> 9

T= Temperatura

APT = Agar "All Purpose Tween"

MRS = Agar Man, Rogosa y Sharpe

En la tabla 21 se muestran los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana. Se logró identificar tres cepas de bacterias lácticas que inhiben el crecimiento de *E. coli*, *S. typhimorium* y *L. monocytogenes*. También una cepa que presentó actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. typhimorium* y dos que presentaron actividad contra *S. typhimorium*.

Tabla 21. Actividad antimicrobiana de las BL<sub>Apan</sub>.

Cepa	No.	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimorium</i>
BL <sub>Apan</sub> 1	7	✓✓✓	✓✓✓✓	✓✓
BL <sub>Apan</sub> 2	8	✓✓	✓✓✓	✓
BL <sub>Apan</sub> 3	9	✓✓✓	✓✓✓✓	✓
BL <sub>Apan</sub> 4	13	x	x	x
BL <sub>Apan</sub> 5	14	x	✓✓✓	✓
BL <sub>Apan</sub> 6	16	x	x	x
BL <sub>Apan</sub> 7	17	x	x	✓
BL <sub>Apan</sub> 8	18	x	x	x
BL <sub>Apan</sub> 9	19	x	x	✓✓

Crecimiento: x= nulo, ✓= bajo, ✓✓= medio, ✓✓✓= alto, ✓✓✓✓= muy alto

De las bacterias lácticas aisladas (BL<sub>Apan</sub>) 6 de las 9 cepas evaluadas presentan actividad antimicrobiana contra los siguientes patógenos: *Salmonella typhimorium*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*.

Las BL<sub>Apan</sub> sirven como modelo de estudio para entender la respuesta fisiológica y metabólica de estas bacterias nativas de pulque artesanal, al someterlas a condiciones de almacenamiento en frío, para caracterizar y preservar una bebida ancestral, al correlacionar los cambios que se encontraron en la composición del pulque almacenado a bajas temperaturas con los microorganismos que toleran estas temperaturas.

## Capítulo IV. Conclusiones y perspectivas

De los métodos de conservación por bajas temperaturas empleados para el aguamiel, pulque y semilla, el que mostró mejores resultados fue la ultracongelación, ya que mantiene mejor las propiedades fisicoquímicas en un periodo de siete días.

La conservación de la semilla mediante la ultracongelación mostro cambios en las propiedades fisicoquímicas del día tres al día siete, en el día tres solo se mantienen dentro de los parámetros permitidos cuatro de las diez propiedades y conforme avanza el tiempo conserva más propiedades (ocho de diez) cuando se llega al día siete. Demostrando así que mantiene una calidad del 80% con respecto a la muestra fresca.

Se logró identificar bacterias lácticas ( $BL_{Apan}$ ) de pulque artesanal conservado en condiciones de ultracongelación. Las bacterias ácido lácticas se consideran mesófilas o termófilas de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento.

Sin embargo aún es necesario caracterizar las  $BL_{Apan}$  mediante identificación molecular y pruebas bioquímicas, así como también pruebas de crecimiento para determinar la manera en la que estas bacterias toleran las bajas temperaturas.

Aún se requiere hacer un análisis de los parámetros evaluados durante un mayor tiempo de evaluación, así como correlacionar los cambios fisicoquímicos con el análisis microbiológico.



## Anexo 1

### Preparación de muestras para pruebas fisicoquímicas.

Actividades		Días																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Preparación de soluciones químicas para las pruebas fisicoquímicas.		■																					
Aguamiel	Recepción y análisis de la muestra fresca, aplicando todas las pruebas fisicoquímicas.	■																					
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de la muestra fresca.				■																		
	De acuerdo a la cantidad de muestra sobrante se guardan por partes iguales en 6 frascos de vidrio con tapa estériles. Posteriormente son guardados, dos frascos por equipo de conservación a bajas temperaturas. Los equipos son: refrigerador, congelador y ultra congelador.	■																					
	Se descongela un frasco por cada equipo de conservación, para analizar las primeras 8 pruebas fisicoquímicas (humedad, cenizas, sedimentación, pH, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, azúcares totales y azúcares reductores).					■				■										■			
	Se descongela el segundo frasco por equipo de conservación para analizar las 3 últimas pruebas fisicoquímicas (acidez total, viscosidad y porcentaje de proteínas).						■				■										■		
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de las muestras conservadas.							■				■										■	
Pulque	Recepción y análisis de la muestra fresca, aplicando todas las pruebas fisicoquímicas.		■																				
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de la muestra fresca.					■																	
	De acuerdo a la cantidad de muestra sobrante se guardan por partes iguales en 6 frascos de vidrio con tapa estériles. Posteriormente son guardados, dos frascos por equipo de conservación a bajas temperaturas. Los equipos son: refrigerador, congelador y ultra congelador.		■																				
	Se descongela un frasco por cada equipo de conservación, para analizar las primeras 8 pruebas fisicoquímicas (humedad, cenizas, sedimentación, pH, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, azúcares totales y azúcares reductores).						■				■										■		
	Se descongela el segundo frasco por equipo de conservación para analizar las 3 últimas pruebas fisicoquímicas (acidez total, viscosidad y porcentaje de proteínas).							■				■										■	
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de las muestras conservadas.								■				■										■
Semilla	Recepción y análisis de la muestra fresca, aplicando todas las pruebas fisicoquímicas.			■																			
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de la muestra fresca.						■																
	De acuerdo a la cantidad de muestra sobrante se guardan por partes iguales en 6 frascos de vidrio con tapa estériles. Posteriormente son guardados, dos frascos por equipo de conservación a bajas temperaturas. Los equipos son: refrigerador, congelador y ultra congelador.			■																			
	Se descongela un frasco por cada equipo de conservación, para analizar las primeras 8 pruebas fisicoquímicas (humedad, cenizas, sedimentación, pH, sólidos solubles (°Brix), grado alcohólico, azúcares totales y azúcares reductores).							■				■										■	
	Se descongela el segundo frasco por equipo de conservación para analizar las 3 últimas pruebas fisicoquímicas (acidez total, viscosidad y porcentaje de proteínas).								■				■										■
	Obtención de los resultados de la prueba de sedimentación de las muestras conservadas.									■				■									■

## Preparación de muestras para prueba microbiológica

- |   |
|---|
| 1. Las muestras se procesaron para obtener diluciones seriadas ( $10^{-1}$ hasta $10^{-5}$ ), utilizando como diluyente agua peptonada al 0.1%.   |
| 2. Se utilizó la técnica por vaciado en placa, el método consiste en contar las colonias que crecen en el medio de cultivo (Agar APT y MRS) después de 48 h de incubación a $35^{\circ}$ . Para las levaduras se utilizó la misma técnica en agar PDA después de 24, 48 y 72 h de incubación a $30^{\circ}\text{C}$ . Suponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio, los resultados se reportan como UFC/g de muestra. |

## Anexo 2

### Preparación de soluciones

- Solución de hidróxido de sodio al 50%

Se preparó una cantidad de 500 ml para ello se pesaron 250 g de hidróxido de sodio, después se colocó en un matraz aforado de 500 ml, se agregó agua destilada en pausas mientras se realizaba una agitación suave manual, hasta aforar. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio.

- Solución de glucosa 1 mg/ml

Se preparó una cantidad de 100 ml para ello se pesaron 0.1 g de glucosa, después se colocó en un matraz aforado de 100 ml, se agregó agua destilada hasta aforar, por último, se realizó una agitación suave manual. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio.

- Solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Se disolvió 1.6 g de hidróxido de sodio en 50 ml de agua destilada con agitación continua, luego se adiciono 30 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 1 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico). El vaso de precipitado donde se está llevando a cabo la mezcla se cubre con papel aluminio. Esta mezcla se aforo a 100 ml con agua destilada y se almaceno en un frasco ámbar dejándolo en agitación una noche.

- Solución de fenol al 5%

Se preparó una cantidad de 25 ml para ello se pesaron 1.25 g de fenol, después se colocó en un matraz aforado de 25 ml, se agregó agua destilada hasta aforar, por último, se realizó una agitación suave manual. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio.

- Solución de hidróxido de sodio al 0.1M

Se preparó una cantidad de 200 ml para ello se pesaron 0.79994 g de hidróxido de sodio, después se colocó en un matraz aforado de 200 ml, se agregó agua destilada hasta aforar, se realizó una agitación suave manual. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio.

- Solución de ácido clorhídrico al 0.1M

Se preparó una cantidad de 100 ml para ello se midieron con una pipeta 0.9038 ml de ácido clorhídrico en una campana de extracción, primero se le agregó al matraz aforado de 100 ml, un poco de agua destilada, después se agregó el ácido clorhídrico dejándolo deslizar lentamente por las paredes, se continuó

agregando el agua destilada hasta aforar. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio.

- Solución de fenolftaleína

Se preparó una cantidad de 100 ml para ello se pesaron 0.5 g de fenolftaleína, después se colocó en un matraz aforado de 100 ml, a continuación, se agregó alcohol del 96% hasta aforar, se realizó una agitación suave manual. Posteriormente se guardó en un frasco de vidrio color ámbar.

- Agua peptonada al 0.1%

Se preparó una cantidad de 1 litro para ello se pesaron 1 g de agua peptonada, después se colocó en un matraz aforado de 1 litro, se agregó agua destilada hasta aforar (en caso de ser necesario, calentar la solución para disolver completamente el polvo), posteriormente la solución se colocó en un frasco de 1 litro y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

La preparación de los medios de cultivo se realizó de acuerdo a lo indicado por las fichas técnicas.

- Agar APT

Rehidratar 61.2 g del medio en un litro de agua destilada, dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. No sobreesterilizar. Enfriar a 45°C antes de usarlo (Dibico APT, s.f.).

- Agar MRS

Rehidratar 67 g del medio en un litro de agua destilada, dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. No sobreesterilizar. Enfriar a 45°C antes de usarlo en las cajas Petri estériles (Dibico MRS, s.f.).

- Agar PDA

Suspender 39 g del medio deshidratado en un litro de agua purificada, dejar remojar de 10 a 15 minutos. Calentar agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, enfriar a 40 - 45 °C y vaciar en cajas Petri. Cuando el medio se va a utilizar para cuenta en placa para determinar el contenido de levaduras y mohos, la reacción deberá ajustarse, al momento de vaciar las placas, a un pH de 3.5 + 0.1, agregar 14 ml de ácido tartárico esterilizado al 10% a cada litro del medio fundido y enfriado a 45°C. No recaliente el medio después de la adición del ácido tartárico (Bioxon, s.f.).

## Referencias

Aguilar J. (2012). Métodos de conservación de alimentos. 1a. Ed. Roja Tercer Milenio SC. 16–29.

Álvarez A. (s.f.). Procesos y métodos de congelación. Ingeniería y Tecnología Frigorífica. <https://ingenieriadelfrio.wixsite.com/academico/procesos-y-metodos-de-congelacion>

Álvarez G., Figueredo C. y Casas A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: management of a fermented beverage in Michoacán, México. México. Journal foods.1-17. DOI: 10.3390/foods9030361

Álvarez M.C., García E., Suárez J., Luna M. y Rodríguez M. (2018). Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. Polibotánica. 45. DOI: 10.18387/polibotanica.45.15

Álvarez T. (2021). Efectos de la congelación y ultracongelación en la estructura y textura de frutas y vegetales. Tesis de Ingeniería. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.18.

Arias S., Ceballos A. y Gutiérrez L. (2019). Evaluación de los parámetros del proceso de congelación para la pulpa de Açaí. TecnoLógicas. 26. ISSN-p 0123-7799

Arroyo C. y Reynoso C. (2016). Efecto de las bajas temperaturas en las características fisicoquímicas del pulque. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias (*Agave salmiana Xamini*), 20–21. ISSN: 2410-356X

Asociación Oficial de Químicos Analistas (1990). Procedimiento número 964.22

ASSAL (2010). Grado alcohólico en vinos. <https://www.assal.gov.ar/assa/documentacion/234grado-alcoholico.pdf>

Ávila R., Rivas B., Hernández R. y Chirinos M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. Multiciencias. 129-135. ISSN: 1317-2255.

Balaguera A., Camacho A., Joya F., Sánchez A. y Vergara H. (2018). Análisis fisicoquímico de alcoholes. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Colombia.1-6.

Balboa K. (2020). Cómo conservar el pulque fresco. Conservatodo. Recuperado de <https://conservatodo.com/conservar-pulque>

Balladares E. (2015). El análisis químico del pulque en el siglo XIX. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. Ciudad de México. 129.

Bautista N. (2006). Estudio químico-bromatológico y elaboración de néctar de aguamiel de *Agave americana* L. (maguey) procedente de Ayacucho. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad farmacia y bioquímica. Perú. 46.

Belén D., Ramírez N., Moreno M.J. García D. y Medina C. (2005). Evaluación fisicoquímica de pulpa de coroba (*Jessenia polycarpa* Karst) almacenada en condiciones de congelación. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 25. ISSN: 1135-8122

Bioxon, (s.f.). Agar de dextrosa y papa 211900. Medios de cultivo deshidratados.

Britanialab (2021). Agar MRS. Medios de Cultivo deshidratados. Rev. 02.

Bulnes F. (1909). El pulque. Antigua imprenta de Murguía.

Cervantes M. y Pedroza A. (2007). El Pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. Nova. 5(8). ISSN: 1794-2470

Chagua P., Malpartida R., y Ruiz A. (2020). Tiempo de pasteurización y su respuesta en las características químicas y de capacidad antioxidante de aguamiel de *Agave americana* L. Investigaciones Altoandinas. 45–53. DOI: <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.532>

Chang R. y College W. (2002). Química general. 7° ed. 601. ISBN: 970 10 3894 0

Chemical and foods. (2022). Importancia del pH en los Alimentos. <https://chemicalandfoods.com/importancia-del-ph-en-los-alimentos/#:~:text=La%20mejor%20manera%20de%20medir,activarlo%20la%20diferencia%20de%20potencial>

Corona A. (2021). Ozonización para la estabilidad microbiológica, calidad fisicoquímica y nutracéutica de aguamiel de agave. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Estado de México. 61.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. [http://www.fbd.org/wp-content/uploads/2013/01/The\\_Big\\_Thaw\\_SP.pdf](http://www.fbd.org/wp-content/uploads/2013/01/The_Big_Thaw_SP.pdf) 1-2."

Dibico APT. (s.f.). Agar APT 1093. Medio de cultivo. Bacteriología general.

Dibico MRS. (s.f.). Agar MRS 1276. Medio de cultivo. Bacteriología general.

Dibico PDA. (s.f.). Agar PDA 1059. Medio de cultivo. Bacteriología general.

Dirección general de normas. (1972). Norma Mexicana NMX-V-029-1972 "Método de prueba para la determinación de Proteína en Aguamiel". <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=RVVmUzVrQW9iV1INdFVvK2hEWTRFdz09>

Dirección general de normas. (1972). Norma Mexicana NMX-V-041-1972 "Método de prueba para la determinación del pH en Pulque". <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=ZzFtOHhnaHJ0QIE4WVY3VDICWUVjUT09>

Dirección general de normas. (1972). Norma Mexicana NMX-V-042-1972 "Método de prueba para la determinación de Acidez total en Pulque". <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=SIBVSIhaWXA1NHITOGMzQVV3SmVPdz09>

Dirección general de normas. (1972). Norma Mexicana NMX-V-045-1972 "Método de prueba para la determinación del Índice de refracción con el refractómetro de inmersión". <https://www.sinec.gob.mx/SINEC/Vista/Normalizacion/DetalleNMX.xhtml?pidn=bVM2eUIUc0xlaXdobk15TmR4c2dQUT09>

Dirección general de normas. (1972a). Norma Mexicana NMX-V-022-1972 "AGUAMIEL" "HYDROMEL". <https://media.gotomexico.today/reglament/nmx-v-022-1972.pdf>

Dirección general de normas. (1972b). Norma Mexicana NMX-V-037-1972 PULQUE MANEJADO A GRANEL. <https://media.gotomexico.today/reglament/nmx-v-037-1972.pdf>

Dirección general de normas. (1980). Norma Mexicana NOM-F-68-S-1980, Alimentos Determinación de Proteínas. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980#gsc.tab=0)

Dirección general de normas. (2003). Norma Mexicana NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=690308&fecha=12/09/2003#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=690308&fecha=12/09/2003#gsc.tab=0)

DuBois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. y Smith F. (1956). "Colorime tric method for determination of sugars and related substances". *Anal Chem.* 350-356. DOI 10.1021/ac60111a017.

Erlwein S., Mira J. y Velasco A. (2013). Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo. En *Ejercicios etnográficos. Aprendiendo a investigar.*

Escalante A. y Gosset G. (2008). El pulque, una bebida con un gran pasado y ¿un futuro incierto?. *Academia de Ciencias de Morelos, A.C.* 22.

Escalante A., Giles-Gómez M., Esquivel G., Matus V., Moreno R., López A. y Lappe P. (2012). Pulque fermentation. *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology.* Vol II. Chapter 43. 703–704.

Escalante A., Giles-Gómez M., Hernández G., Córdova-Aguilar M.S., López-Munguía A., Gosset G. y Bolívar F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. Vol. 124. International Journal of Food Microbiology, 126-134.

Escalante A., López D., Velázquez J., Giles-Gómez M., Bolívar F. y López A. (2016). Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. Microbiol frontal. 3. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01026

Estrada S. (2020). Tinción de Gram. Recuperado el 30 de junio de 2023 de <https://www.kapitalinteligente.es/tincion-de-gram/>

Espíndola V., Trejo M.A., Lira A. y Pascual S. (2018). Caracterización de aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 3. 524.

FDACS. (2017). Descongelar Alimentos. Division of food safety. <https://www.fdacs.gov/content/download/74239/file/thawing-food-spanish.pdf>

Fernández A., García de la fuente C., Sáez J. y Valdezate S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. ISBN: 978-84-614-7932-0

Flores A. y Romero L. (2008). Caracterización fisicoquímica del aguamiel producido por tres variedades de *agave* spp. cultivadas en el estado de Tlaxcala. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. 1-16.

García E. (2017). Diseño de un proceso estandarizado aplicado en la producción de pulque. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de ciencias básicas e ingeniería. Hidalgo, México. 43-48.

García R., Torres J., Pinto A., González J., Rengel J. y Pérez N. (2016). Diseño de una estrategia de control difuso aplicada al proceso de ultracongelación de alimentos. Chilena de Ingeniería. 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052017000100070>

Garrido M., Rocha J., Delgado J. y Martillanes S. (2020). Procesos tecnológicos en la industria alimentaria. ISBN Digital: 9788413575001. 15.

Godoy A., Herrera T. y Ulloa M. (2003). Mas allá del pulque y el tepache. 1ª. Ed. Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM. Pág. 70. ISBN: 970-32-0638-7

Gómez A., Cerón T., Rodríguez V. y Vázquez M. (2007). Aspectos tecnológicos de la congelación en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 1. 81.

González L., Castello P., Gagliardino J. y Rossi J. (2000). La glucosilación no enzimática de proteínas. Ciencia al Día Internacional. 1-17. ISSN: 0717-3849.



Gonzalo C. y Cruz L. (1965). Control de calidades de pulques que se consumen en el D. F. Vol. VII. Núm. 5. 675–703.

Guevara A. y Cancino K. (2008). Métodos apropiados para inactivar o controlar el deterioro microbiológico en alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Industrias Alimentarias. Perú. 3-4.

Gutiérrez E. (2015). Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Distrito Federal. 18.

Gutiérrez S. (2008). Esterilización por filtración. Practica núm. 9. Universidad Central de Venezuela. 1.

Guzmán R. y Contreras J. (2018). Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición. Revista Mexicana de Biotecnología. 10. ISSN: 2448-6590

Hernández E. (2013). Análisis de la cadena productiva del pulque del Estado de México y Tlaxcala. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México. 22-23.

Hernández O. (2013). Conservación de los alimentos por frío. Conservación en frío. 2-3.

Iturbe F. y Sandoval J. (2011). Análisis de alimentos fundamentos y técnicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 1-128.

Juliarena P. y Gratton R. (2012). Conservación de los alimentos. Cap 3. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 1-5.

Latham M. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Colección FAO: Alimentación y nutrición. ISBN 92-5-303818-7. Cap. 9.

López E. (2018). Optimización del proceso de termoultrasonido en aguamiel de maguey manso (*Agave atrovirens* Karw) sobre sus propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Nutrición. Hidalgo, México. 13.

Luis G. M., Peña V., Reyna W., Domínguez L., y Martínez J. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. Journal of Negative and No Positive Results. 4(12). DOI: <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3148>

Martínez V. (2020). Propiedades del aguamiel. Botanical on-line. <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/aguamiel-propiedades>

MacFaddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3° Ed., Panamericana. 73. ISBN: 950-06-1572-X.

Medina C., Roldán E., y Vázquez M. (2022). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y pulque del Alto Mezquital, Hidalgo.

Mena A. (2013). Carbonatación de aguamiel. Tesis de Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ciencia Animal. Saltillo Coahuila, México. 55 -57.

Méndez L. (2020). Manual de prácticas de análisis de alimentos. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica. Veracruz, México. 1-150.

Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31. 426-428

Ministerio de sanidad y consumo. (2007). Alcohol. Secretaria general de sanidad. 37. ISBN: 978-84-920522-2-6

Moreno C. (2016). Forma de conservación de alimentos II. Núm. 53. Secretaria de Agroindustria. 1-5.

Muñiz D., Rodríguez R.M., Rodríguez R., Contreras J., y Aguilar C. (2013). Producción artesanal del aguamiel: una bebida tradicional mexicana. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 13.

Muñumel J. (2007). Sistemas y métodos de conservación, refrigeración y regeneración de alimentos: caracterización de cada uno de ellos, indicando equipos necesarios, diferencias, ventajas, procesos de ejecución de cada uno explicando los resultados que se deben obtener. Sistemas y Métodos de Conservación. Tema 16. <https://www.preparadores.eu/metodos-conservacion-alimentos/>

Navarrete Ma C. y García C. (2021). The pulk the drink of the gods with milenary value and tradition. Journal of Tourism and Heritage Research. 19–36. ISSN-e 2659-3580

Palafox L. (2017). Desarrollo de alternativa de consumo de productos de maguey mediante la microfiltración de aguamiel y pulque de los estados de Puebla y Tlaxcala. Tesis de Maestría. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Colegio de Postgraduados. Campus Córdoba. Veracruz, México. 36.

Pillajo J. (2015). Estudio de la fermentación del aguamiel de la penca (*Agave americana L.*) para la obtención de una bebida alcohólica fermentada. Tesis de ingeniería. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Ecuador. 27.

Polo D. (2021). Manual para aprender a hacer pulque. Milpa Alta. 55.

Porras O. (2018). Manual de análisis químico e instrumental. Fundamentos de análisis químico. Tomo II. Instituto Universitario de la Paz. 1-61.

- Preciado J. (2013). Revista Pulquimia. Año 1, Vol. 1, Núm. 2. 8.
- Quintero S. y Bonilla M. (2018). La ultracongelación como método de preservación y conservación de la granadilla (*Passiflora ligularis juss*). Revista Tecnología y Productividad.198–199. DOI: <https://doi.org/10.23850/24632465.2343>
- Ramírez A. (2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueeckii* subsp. *Bulgaricus*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Ciudad de México. 32.
- Ramírez M.A., Hernández H., Cruz M.T. y Gallardo Y., (2001). Caracterización de fructooligosacáridos en aguamiel y jugos del *Agave atrovirens* Karw. Ciencia y tecnología de alimentos. 1.
- Reyes F., Palou E. y López A., (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 69.
- Rocha M. y Rojas M. (2009). Caracterización del proceso de secado por aspersión del aguamiel. Tesis de Ingeniería. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Ciudad de México. 9-15.
- Rodríguez F., Urbina H. y Zapata A. (2021). Pulque: Probiotic content and potential in the biotechnology industry. Revista RD-BUAP. 96. ISSN: 2448-5829
- Rodríguez J., Ruiz L., Santoyo M.A. y Miranda L. (2016). Determinación del índice de acidez y acidez total de cinco mayonesas. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 844. 843-849.
- Romero M. R., Osorio P., Flores A., Robledo N. y Mora R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentation. Revista Mexicana de Ingeniera Química, 14(2). ISSN: 1665-2738
- Salvatierra I. (2019). Manual conservación de alimentos. Escuela Hotelería, Turismo y Gastronomía. Vicerrectoría Académica. Académica Inacap sede Arica. Versión 2. 55.
- Sepulveda L. (2020). Evaluación del efecto estacional sobre el microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas. Chihuahua, México. 77.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). Maguey pulquero. <https://www.gob.mx/siap/articulos/maguey-pulquero?idiom=es>

Tirado D.F., Yacub B., Cajal J., Murillo L., Leal R., Franco M., Escobar B. y Acevedo D. (2017). Milk pasteurizer for the elaboration of sour cream. *Entre Ciencia e Ingeniería*. 37. ISSN: 1909-8367.

Trujillo S. y Claros A. (2020). Evaluación de los parámetros de calidad bajo la influencia de arvenses sobre la naranja tangelo en la finca la Granja vereda el Tablón, Municipio de la Plata, Huila. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente. Colombia. 20 - 22.

Umaña E. (2007). Conservación de alimentos por frío. *FIAGRO Y FUSADES PROINNOVA*. 1-235

USDA. (2013). El descongelar completamente. Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos

Valadez M. (2014). Pulque limpio / pulque sucio: disputas en torno a la legitimidad y la producción social del valor. *Revista Colombiana de Antropología*, 50(2). ISSN: 0486-6525

Valdivieso D., Vargas C., Mondragón N., Galván G., Gilés-Gómez M., Bolívar F. y Escalante A. (2021). Sustainable production of pulque and maguey in México: current situation and perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 1-19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.678168>

Vizcarrondo M. y Gutiérrez S. (2008). Morfología y tinción de los microorganismos. N. 6. Facultad de Farmacia. Venezuela.1-2.