

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS



CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN AGROINDUSTRIA

***DESARROLLO DE ALTERNATIVA DE CONSUMO DE
PRODUCTOS DE MAGUEY MEDIANTE LA MICROFILTRACIÓN
DE AGUAMIEL Y PULQUE DE LOS ESTADOS DE PUEBLA Y
TLAXCALA***

LILIANA PALAFOX GONZÁLEZ

TESINA PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA TECNOLÓGICA EN AGROINDUSTRIA

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2017

La presente tesina, titulada: **Desarrollo de alternativa de consumo de productos de maguey mediante la microfiltración de aguamiel y pulque de los estados de Puebla y Tlaxcala**, realizada por la alumna: **Liliana Palafox González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA TECNOLÓGICA
AGROINDUSTRIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____


Dra. Adriana Contreras Oliva

ASESOR: _____


Dr. José Andrés Herrera Corredor

ASESOR: _____


Dr. Fernando Carlos Gómez Merino

ASESOR: _____


Dr. Juan Valente Hidalgo Contreras

DESARROLLO DE ALTERNATIVA DE CONSUMO DE PRODUCTOS DE MAGUEY MEDIANTE LA MICROFILTRACIÓN DE AGUAMIEL Y PULQUE DE LOS ESTADOS DE PUEBLA Y TLAXCALA

Liliana Palafox González

Colegio de Postgraduados, campus Córdoba, 2017

El aguamiel es la savia obtenida de los denominados magueyes pulqueros, la cual se fermenta y se obtiene una bebida alcohólica llamada pulque. Ambos productos presentan una corta vida de anaquel dada su riqueza microbiana, de ahí que el objetivo del presente proyecto es elaborar bebidas derivadas del microfiltrado de aguamiel y pulque de los estados de Puebla y Tlaxcala.

Se evaluó el efecto que tiene esta tecnología sobre las características de dichos productos, para lo cual se caracterizó tanto el jugo azucarado como la bebida fermentada, determinando parámetros fisicoquímicos (sólidos solubles totales o SST, pH, densidad, contenido alcohólico). El análisis microbiológico se realizó en muestras sin tratamiento como en el producto ya microfiltrado; posteriormente éste fue utilizado para la elaboración de bebidas, las cuales fueron evaluadas por un panel de jueces no entrenados.

Los resultados fisicoquímicos de aguamiel de la región de Nanacamilpa mostraron que la savia contiene 12.1 ± 1.4 °Brix y un pH igual a 6.0 ± 0.4 , parámetros que no fueron afectados a pesar de que el producto fue microfiltrado, a diferencia del contenido microbiano, el cual si tuvo diferencias significativas, mismas que fueron favorables, haciendo una bebida estéril. Para el caso del pulque procedente de Puebla y Tlaxcala, las muestras tuvieron un cambio significativo ($P \leq 0.05$) en el contenido de SST, así como en el contenido microbiano, el cual, al igual que en el aguamiel es favorable para la conservación del producto. Las bebidas desarrolladas presentaron puntuaciones por arriba de la media de la escala hedónica (5 = me gusta ligeramente), siendo los sabores de horchata combinado con aguamiel microfiltrado (AMM) (8.2 ± 0.7), piña-coco con pulque microfiltrado procedente de Puebla (7.4 ± 2.1) y nuez con pulque tratado procedente de Tlaxcala (6.3 ± 2.3) las de mejor puntuación.

Por lo tanto, la microfiltración, se puede considerar como una alternativa de procesamiento para mantener las características natas del pulque y jarabe de maguey, la cual alarga la vida útil de las mismas; así mismo el producto obtenido de este tratamiento se puede combinar con ciertos ingredientes y dar alternativas de consumo de estas tradicionales bebidas mexicanas.

Palabras clave: Savia, bebida alcohólica, microfiltración, fisicoquímico, microbiológico, sensorial.

CONTENIDO

LISTA DE ILUSTRACIONES	VI
LISTA DE TABLAS	VII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	- 1 -
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	- 3 -
2.1 MAGUEY (<i>Agave spp.</i>).....	- 4 -
2.1.1 Características morfológicas.	- 4 -
2.1.2 Productos derivados del maguey.	- 5 -
2.2 AGUAMIEL	- 6 -
2.2.1 Características fisicoquímicas del aguamiel	- 8 -
2.2.1 Características bioactivas del aguamiel	- 9 -
2.3 PULQUE	- 10 -
2.3.1 Proceso de elaboración del pulque	- 10 -
2.3.1.1 Microorganismos responsables del proceso fermentativo del pulque	- 11 -
2.3.2 Flora microbiana característica del pulque	- 12 -
2.3.3 Características fisicoquímicas del pulque	- 13 -
2.3.4 Propiedades bioactivas del pulque.....	- 14 -
2.4 TECNOLOGÍA DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS	- 16 -
2.4.1 Microfiltración	- 17 -
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN.....	- 18 -
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 21 -
4.1 HIPÓTESIS.....	- 22 -
4.2 OBJETIVO GENERAL.....	- 22 -
4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	- 22 -
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS	- 23 -
5.1 MATERIA PRIMA	- 24 -
5.1.1 Nanacamilpa de Mariano Arista	- 24 -
5.1.2 Zozutla.....	- 24 -
5.2 CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTO.....	- 27 -
5.2.1 Aguamiel.	- 27 -
5.2.2 Pulque	- 27 -

5.3 MICROFILTRACIÓN.....	- 29 -
5.4 FORMULACIÓN DE BEBIDAS.	- 30 -
5.5 DETERMINACIÓN DE NIVEL DE AGRADO DE BEBIDAS DESARROLLADAS	- 32 -
<i>CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	- 33 -
6.1 MICROFILTRACIÓN DE AGUAMIEL	- 34 -
6.2 MICROFILTRACIÓN DE PULQUE	- 36 -
6.3 RESULTADOS DE NIVEL DE AGRADO	- 41 -
6.3.1 Bebida a partir de aguamiel microfiltrado.....	- 41 -
6.3.2 Bebida a partir de pulque microfiltrado.....	- 42 -
<i>CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN</i>	- 44 -
<i>CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS.....</i>	- 47 -
ANEXOS.....	- 52 -

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración I. <i>Plantación de agaves</i>	4
<i>Ilustración II. Productos derivados de maguey pulquero: Aguamiel y Pulque.....</i>	5
<i>Ilustración III. Meyolote (a) e imagen de aguamiel dentro del coco de maguey (b).....</i>	6
<i>Ilustración IV. Acocote utilizado en una hacienda pulquera de Tlaxcala (a), Alacate utilizado en Zozutla, Yehualtepec, Puebla (b) y Proceso de extracción de aguamiel (c).....</i>	7
Ilustración V. Ocascle o raspador (a) y proceso de raspado de maguey (b).....	7
Ilustración VI. <i>Agave americana</i> (Bowell, 2010) (a) y <i>Agave mapisaga</i> blanco (b)	10
Ilustración VII. Microorganismos presentes en una muestra de pulque.....	13
Ilustración VIII. Clasificación de la separación por membranas	16
Ilustración IX. Corrientes de entrada y salida durante un proceso de separación por membranas	17
Ilustración X. <i>Agave mapisaga</i> blanco en plena producción de aguamiel.....	25
Ilustración XI. Maguey denominado regionalmente orospeño.....	25
Ilustración XII. Proceso de elaboración de pulque en la región de Zozutla.....	26
Ilustración XIII. Sistema de microfiltración.....	29
Ilustración XIV. Pulque sin tratamiento (a), Pulque microfiltrado (b) y Pulque tratado térmicamente (c).....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Características fisicoquímicas y nutrimentales de aguamiel, de acuerdo a su clasificación con respecto a la norma NMX-V-022-1972.....	8
Tabla II. Características fisicoquímicas de pulque de acuerdo a su clasificación	14
<i>Tabla III. Formulación de bebidas a partir de aguamiel microfiltrado.</i>	<i>30</i>
Tabla IV. Formulación de bebidas a partir de pulque microfiltrado procedente de Nanacamilpa	30
Tabla V. Formulación de bebidas a partir de pulque microfiltrado procedente de Zozutla.....	30
Tabla VI. Características de aguamiel de maguey manso de la región de Nanacamilpa, Tlaxcala	33
Tabla VII. Caracterización de pulque de la región de Nanacamilpa, Tlaxcala y Zozutla, Yehualtepec-Puebla sin tratamiento y microfiltrado	36
Tabla VIII. Resultados de aceptabilidad general de formulaciones desarrolladas a partir de aguamiel microfiltrado del municipio de Nanacamilpa.....	41
Tabla IX. Resultados de aceptabilidad general de formulaciones desarrolladas a partir de pulque tratado del municipio de Nanacamilpa y la región de Zozutla.....	42

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida mexicana tradicional que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007), consumida por lo general en las áreas de la meseta central (Escalante *et al.*, 2008). Es una bebida alcohólica no destilada, blanca y espesa, extraído de diferentes especies de agaves, denominados en general como magueyes pulqueros (Escalante *et al.*, 2008; Muñiz-Márquez *et al.*, 2015).

Continuamente se han buscado métodos de conservación que permitan la comercialización de este producto, pudiendo expandir el canal de ventas más allá de la región donde se procesa, es así que se ha llegado a enlatar, tal como lo hizo la empresa Productos Naturales de Agave S.A. de C.V., ubicada en Nanacamilpa, Tlaxcala, inclusive se comercializa como destilado por un grupo denominado PULCATTÁ, ubicado en el estado de Puebla.

El esfuerzo por mantener viva esta bebida milenaria es clara, por lo que la aplicación de otras tecnologías que favorezcan la conservación de este producto puede beneficiar dicha causa, tal es el caso de la Microfiltración, proceso que pertenece a la tecnología de separación por membranas, que sirve como un pretratamiento para remover sólidos suspendidos, polisacáridos, desechos celulares y otros componentes que pueden estar presentes en la solución a tratar, los cuales por lo general no pueden ser eliminados con un método común de filtración (Destro dos-Santos *et al.*, 2016).

En el presente proyecto se aplicó la tecnología antes mencionada sobre aguamiel y pulque, con la finalidad de que esta sirva como un método de conservación que mantenga las características iniciales de las bebidas.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 MAGUEY (*Agave* spp.).

Esta planta pertenece a la familia de las agaváceas, la cual incluye 20 géneros y cerca de 300 especies, de las cuales, cerca de 200 se encuentran en México, siendo de gran interés desde el punto de vista económico, tal es el caso de *Agave salmeana* y *A. atrovirensare*, de los cuales se extrae pulque, *A. potatorum* y *A. angustifolia*, son de interés para la producción de mezcal y *A. tequilana* Weber var. azul, es la variedad utilizada para el procesamiento de tequila (Peña-Álvarez *et al.*, 2004).

2.1.1 Características morfológicas.

El maguey se caracteriza por tener hojas anchas, gruesas y fuertes, llamadas pencas, con presencia de espinas en los costados y en la punta, empalmadas una sobre otra de tal manera que dan lugar a una forma como roseta (Peña-Álvarez *et al.*, 2004; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), tal como se visualiza en la Ilustración I.



Ilustración I. Plantación de agaves (Moreno, 2015).

Las pencas presentan una coloración verde azulado, las cuales pueden llegar a medir hasta un metro de largo, dependiendo del grado de madurez de la planta. Las espinas de las puntas son agudas y de color marrón (Peña-Álvarez *et al.*, 2004). Durante su tiempo de floración, que por lo general es en el mes de Junio, desde el centro de la planta emerge un tallo floral denominado **quiote**, que es donde brotarán las flores que se caracterizan por ser de color amarillo (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Esta planta puede crecer en cerros y barrancas, encontrándose todo el año (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009) y pueden soportar condiciones extremas de sequía, tomando en cuenta que son característicos de zonas semi-desérticas (Muñiz-Márquez *et al.*, 2015).

2.1.2 Productos derivados del maguey.

Toda la planta de maguey puede ser aprovechada en su totalidad, dado que de las hojas se puede obtener *Ixtle*, la cual es una fibra de donde se elaboran desde sogas hasta algunas artesanías. También se puede extraer la savia de la planta, denominada “**Aguamiel**”, de la cual se produce pulque (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009), producto que se abordará más adelante.



Ilustración II. Productos derivados de maguey pulquero: Aguamiel y Pulque (De izquierda a derecha).

Existen otras bebidas que se pueden obtener a partir de maguey, como el mezcal y tequila extraídos del tallo de la planta a la que se le han removido las pencas, conocido como piña, debido a su apariencia, mismo que es sometido a un proceso de cocción, dándose lugar a una hidrólisis de polisacáridos para así producir un jarabe de fructosa y glucosa que después servirá como alimento en el proceso fermentativo, para finalmente llevar a cabo una destilación, obteniendo una bebida con un contenido alcohólico entre 40 a 50% (Peña-Álvarez *et al.*, 2004).

2.2 AGUAMIEL.

Como ya se estableció anteriormente, se le denomina aguamiel a la savia obtenida del maguey; para su obtención primordialmente se debe remover (**capar**) el tallo floral inmaduro, que es de donde se van ramificando las hojas, denomina como **meyolote**. El capado se realiza a determinada edad del agave, dependiendo de cada productor, pudiéndose llevar a cabo desde los 4 a 6 años de edad de la planta (Gómez-Aldape *et al.*, 2012) o hasta los diez años (Rivera-Vargas *et al.*, 2016) o inclusive mayor, quedando así una cavidad en el centro que se le denomina **coco**, dada la apariencia que tiene.



Ilustración III. Meyolote (a) e imagen de aguamiel dentro del coco de maguey (b).

Posteriormente de haber hecho el capado, este es tapado con algunas pencas y/o algunas piedras (Gómez-Aldape *et al.*, 2012), dejando que la planta realice la excreción del néctar, periodo que va desde 3 a 4 días o inclusive de 2 a 4 meses (Rivera-Vargas *et al.*, 2016), lo cual también dependerá de cada productor. Después de haber transcurrido el tiempo de maduración establecido, el aguamiel es recolectado por succión con un instrumento conocido como **Alacate u Acocote** (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

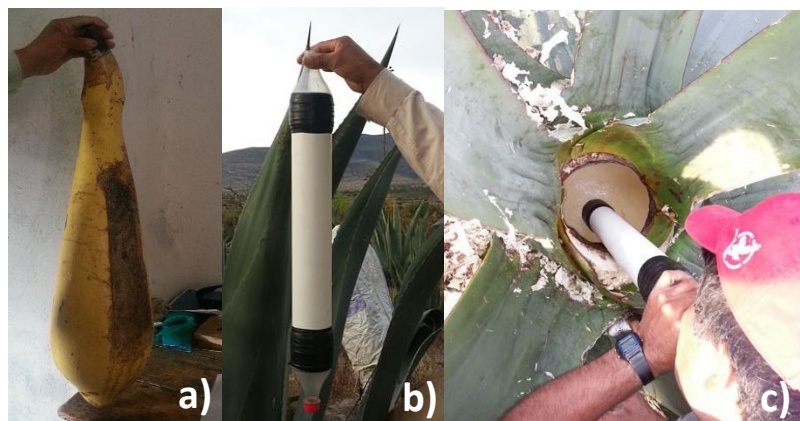


Ilustración IV. Acocote utilizado en una hacienda pulquera de Tlaxcala **(a)**, Alacate utilizado en Zozutla, Yehualtepec, Puebla **(b)** y Proceso de extracción de aguamiel **(c)**.

Posteriormente de realizar el **tlachique** (cosecha de savia de maguey) (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008), se efectúa un raspado del coco para que la planta realice la síntesis de más aguamiel (Gómez-Aldape *et al.*, 2012), utilizando un instrumento conocido como **ocascle**. Por lo general la recolección de aguamiel se lleva a cabo dos veces al día.



Ilustración V. Ocascle o raspador **(a)** y proceso de raspado de maguey **(b)**.

Se estima que un maguey puede excretar hasta 5 L de aguamiel en un lapso de tiempo igual a 12 horas (Gómez-Aldape *et al.*, 2012). El tiempo de producción de la savia por planta puede durar meses, de tal manera que se pueden obtener hasta 300 L de savia por maguey (Rivera-Vargas *et al.*, 2016).

2.2.1 Características fisicoquímicas del aguamiel.

La norma NMX-V-022-1972, indica que el aguamiel se caracteriza por ser un líquido translucido, de color amarillento y con un sabor característico, sobresaliendo el dulzor de éste, debido a la presencia de azúcares como son glucosa, fructosa y sacarosa (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2017), incluyendo fructooligosacáridos (FOS) (Santos-Zea *et al.*, 2016), así como proteínas, gomas y sales minerales.

De su contenido de masa seca (11.5%), los azúcares representan un 75%, de los cuales 10% son FOS, también contiene un 0.3% de aminoácidos libres, 3% de proteína y fibra, respectivamente. En un estudio realizado en aguamiel de *Agave mapisaga*, se determinó 0.26% (base seca) de aminoácidos libres, lo que corresponde 0.3 g/L de aguamiel (Gutiérrez-Uribe *et al.*, 2017).

La misma norma citada anteriormente, indica dos tipos de aguamiel de acuerdo a sus características fisicoquímicas, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla I. Características fisicoquímicas y nutrimentales de aguamiel, de acuerdo a su clasificación con respecto a la norma NMX-V-022-1972.

Especificaciones	Clasificación de aguamiel		
	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	Menor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad en grados Baumé (BE)	5	7	4.5
Sólidos totales (g/100 mL)	13	17	7
Azúcares reductores totales ($g_{glucosa}/100\text{ mL}$)	8	12	6
Proteínas (mg/100 mL)	300	600	100
Acidez ($mg\text{ ácido láctico}/100\text{ mL}$)	≤ 0.90	≤ 1.03	≤ 4.00

Fuente: Norma Mexicana NMX-V-022-1972.

De acuerdo a la tabla anterior, el aguamiel de tipo I, es un producto de alguna manera más fresco, es decir con un grado insipiente de fermentación a diferencia del aguamiel de tipo

II, donde la savia ya presenta un proceso fermentativo avanzado. Otro aspecto del aguamiel de Tipo I, es que este es colectado 60 días después de que el maguey fue capado. Es importante considerar que en el proceso de elaboración de pulque, se suelen mezclar las mieles de plantas con diferentes grados de madurez, por lo que la solución obtenida podría estar dentro de la clasificación de Tipo II (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

2.2.1 Características bioactivas del aguamiel.

De acuerdo a algunos estudios, se ha detectado que la savia del maguey contiene saponinas, compuestos con propiedades nutraseúticas, dado que funcionan como anti-inflamatorios y presentan efectos positivos contra las úlceras (Santos-Zea *et al.*, 2016). También se ha identificado capacidad antioxidante en aguamiel de *Agave salmiana*, teniendo un valor igual a 904.8 μ M reportado como equivalentes de ácido gálico y un contenido de ácido ascórbico igual a 0.14 mg/mL (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

2.3 PULQUE.

El pulque es considerado como una bebida alcohólica tradicional no destilada (Escalante *et al.*, 2008), obtenida como resultado de la fermentación de la savia azucarada, aguamiel, extraída de diferentes especies de maguey, como son: *Agave americana*, *A. ferox*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007); conocidos de manera general como “Magueyes pulqueros” (Muñiz-Márquez *et al.*, 2015). Dadas las evidencias históricas encontradas, es considerado como una bebida ancestral mexicana (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007).

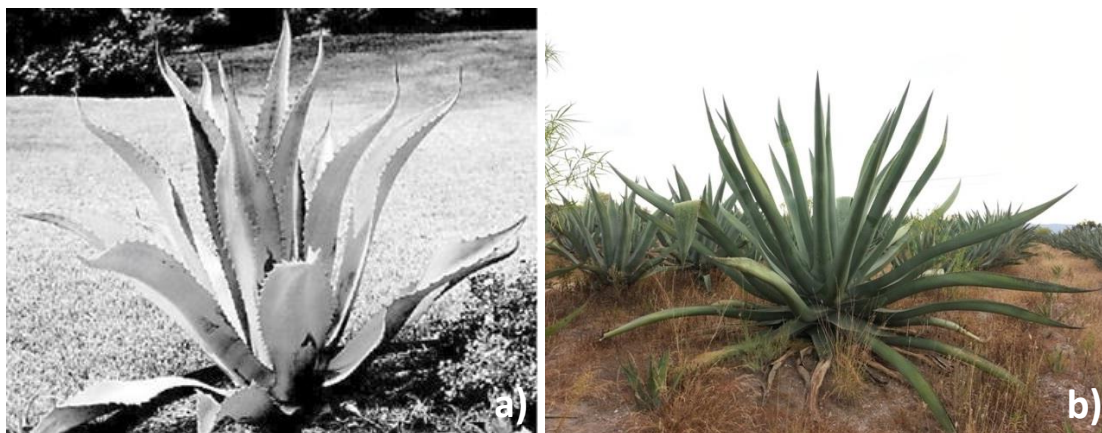


Ilustración VI. *Agave americana* (Bowell, 2010) (a) y *Agave mapisaga* blanco (b).

Actualmente el pulque es producido y consumido principalmente en los estados centrales de México (Escalante *et al.*, 2008), lo cual se relaciona con la ubicación principal de los magueyes pulqueros, siendo Puebla, Hidalgo y el Estado de México primordialmente (Rivera-Vargas *et al.*, 2016).

2.3.1 Proceso de elaboración del pulque.

El proceso inicia a partir del tlachique del aguamiel (Escalante *et al.*, 2008), el cual es transportada a un sitio denominado **Tinancal**, lugar donde se tienen las tinas o recipientes utilizados para el proceso de fermentación, que por lo general se lleva a cabo en condiciones no asépticas, así como todas las demás etapas (Gómez-Aldape *et al.*, 2012).

La forma de elaboración puede variar de acuerdo a la región y productor, pero de manera general el aguamiel es depositado en la tina de fermentación, dando lugar al inicio del proceso fermentativo, donde los microorganismos autóctonos del maguey consumen los azúcares de la savia, reacción que es acelerada al adicionar un inóculo denominado semilla o **nandle**, el cual no es más que pulque ya fermentado (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007; Escalante *et al.*, 2008).

El periodo de fermentación puede durar de 12 a 48 horas a 25°C, produciéndose etanol y algunos exopolisacáridos como β -glucanos y dextranas, los cuales son responsables de la consistencia característica del producto (fluido no newtoniano) (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007). De acuerdo con Escalante *et al.* (2008), el tiempo de fermentación puede variar de acuerdo a la hora de colecta de la savia, misma que es llevada a cabo por las mañanas y por las tardes. Por su parte Gómez-Aldape *et al.* (2012), indican que las variables que van a determinar el tiempo de fermentación son la temperatura ambiental, el tipo de microorganismos y la concentración del agente inoculante adicionado.

Se estima que la etapa fermentativa inicia desde que el aguamiel está dentro del mismo maguey, continuando en las demás etapas del proceso: recolección y reposo en tinas (Escalante *et al.*, 2008; Gómez-Aldape *et al.*, 2012). Es así que la actividad microbiana puede continuar, a pesar de que el pulque haya sido separado de la semilla (etapa final del proceso), siempre y cuando no exista un método de conservación.

2.3.1.1 Microorganismos responsables del proceso fermentativo del pulque

Dentro del maguey existen microorganismos característicos de este sustrato, como son: levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007), las cuales provocan una fermentación natural del aguamiel.

Posteriormente de que se adiciona el nance al aguamiel, se realiza una inoculación de nuevos microorganismos, tal como lo reporta Escalante *et al.* (2008), detectándose en el mosto ya inoculado, *Lactobacillus* spp, bacteria productora de ácido láctico, así como α y γ -Proteobacterias, grupo al que pertenece *Zymomona mobilis* (α -Proteobacteria), que participa en la producción de etanol, junto con otras levaduras.

2.3.2 Flora microbiana característica del pulque.

Las bacterias que se han podido aislar en esta bebida son: *Acetobacter aceti*, *Bacillus simplex*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* spp., *Escherichia* spp., *Kakaria rosea*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus vermiform*, *Macrococcus caseolitycus*, *Mycrococcus luteus* y *Sarcina* spp. Respecto al contenido de levaduras, se encuentran: *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus* spp., *Clavispara lusitaniae*, *Debaryomyces carsonii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Geotrichum candidum*, *Pichia* spp., *Pichia guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula* spp., *R. mucilaginous*, *Saccharomyces bayanus*, *S. pastorianus* y *Torulasporea delbrueckii* (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

También se han podido recuperar microorganismos de gran importancia industrial como levaduras productores de alcohol, tal es el caso de *Saccharomyce cerevisae*, así como algunas especies de *Kluyveromyces*, mismas que son capaces de producir inulinasa. A su vez se han aislado bacterias como es *Zymomonas mobilis* (microorganismo que es inoculado al momento de adicionar la semilla), así como *Leuconostoc mesenteroides*, bacteria que puede sintetizar ácido láctico (Escalante *et al.*, 2008) y se le atribuye la producción de exopolisacáridos, los cuales, como ya se mencionó, le confiere la viscosidad característica a la bebida (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

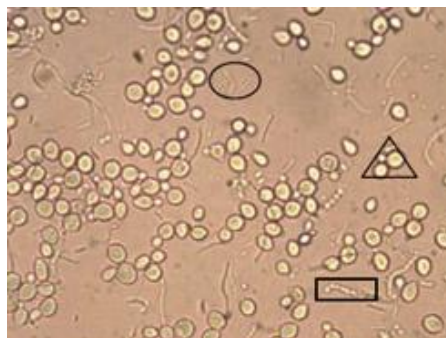


Ilustración VII. Microorganismos presentes en una muestra de pulque (Objetivo 40X): *Zymomonas* (ovalo), *Saccharomyces* (triángulo) y *Leuconostoc* (rectángulo) (Rivera-Vargas *et al.*, 2016).

A partir de un análisis denominado ADNr 16S, en muestras de pulque de diferentes puntos geográficos, se confirmó la presencia de *L. mesenteroides* y *Z. mobilis*, además de identificar Proteobacterias, bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas. Este estudio demostró que independientemente de la región de origen, existe una flora microbiana en común. En particular, este mismo estudio determinó que los microorganismos predominantes pertenecen al género *Lactobacillus* (80.97% del total), identificando que al final de la fermentación sobreviven principalmente *L. acidophilus* (bacteria homofermentativa), *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, los cuales son heterofermentativos, así como proteobacterias, tal es el caso de *Acetobacter malorum* (Escalante *et al.*, 2008).

Es importante recalcar que la carga microbiana desde que el producto es aguamiel, durante y después del proceso fermentativo va cambiando (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017), tal como se muestra en la tabla ubicada en anexos.

2.3.3 Características fisicoquímicas del pulque.

Después del proceso fermentativo, el cual puede durar de acuerdo a diferentes aspectos, pero principalmente con respecto a la viscosidad y el contenido alcohólico del producto final, el pulque presenta una coloración blanca, un olor fuerte, una consistencia viscosa, un contenido alcohólico de 5.4% y un pH que va de 3.5 a 4.2 (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007; Gómez-Aldape *et al.*, 2012).

Al igual que el aguamiel, en el año de 1972, se publicó una normativa donde se establecieron las características que debe tener el pulque de acuerdo a la clasificación por la misma norma, mismas que se pueden observar en la tabla II.

Tabla II. Características fisicoquímicas de pulque de acuerdo a su clasificación.

Especificaciones	Clasificación de aguamiel			
	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
pH	>3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (mg ácido láctico/100 mL)	0.40	0.75	0.40	0.70
Azúcares reductores totales (g glucosa/100 mL)	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico (% Vol.)	6	9	4.0	0.6

Fuente: Norma Mexicana NMX-V-022-1972

El pulque de tipo II o pulque comercial, es elaborado de aguamiel que fue enriquecido por una cantidad determinada de la misma miel de agave. El tipo I, es el producto que se obtiene de pulque de punta, mezcla de aguamiel de Tipo I y semilla, misma que es obtenida de aguamiel que se preparara para lograr una flora microbiana natural. Al tipo I se le puede agregar algún aditivo que favorezca el proceso fermentativo (NMX-V-037-1972).

2.3.4 Propiedades bioactivas del pulque.

Se considera que el pulque es un producto con propiedades curativas, inclusive fue utilizado desde la prehistoria contra dolores y enfermedades estomacales, dadas las evidencias arqueológicas existentes. Actualmente se sabe que tiene efectos probióticos, derivado de la presencia de ciertos microorganismos en la bebida, como son *Zymomonas* spp, *Lactobacillus* spp. y en algunos casos se puede llegar a presentar *Saccharomyces* spp. (Cervantes *et al.*, 2007).

De acuerdo a estudios realizados por Backstrand, Allen, Martínez y Pelto citados por Bowen-Benjamin (2010), establecen que el pulque puede proveer cantidades significativas de vitaminas y minerales, siempre y cuando el producto no sea destilado o demasiado

procesado. También se considera que esta bebida puede proveer de cantidades importantes de ácido ascórbico, hierro, riboflavina, folato, vitamina B, entre otros nutrimentos.

Es utilizado para aliviar algunas enfermedades como infecciones renales, anorexia y problemas gastrointestinales. Inclusive se han realizado estudios en mujeres mexicanas quienes ingieren pulque, resultando que dicho grupo presenta un riesgo menor en tener deficiencia de hemoglobina y ferritina, aunque también existe el riesgo de causar efectos negativos durante su proceso de gestación (Bowell-Benjamin, 2010). Así mismo se ha demostrado que es la primera fuente de ácido ascórbico, dado que contiene 13.3 mg/500 mL, y el tercero en hierro después de las tortillas y leguminosas, dado que su contenido es igual 0.35 mg/500 mL, lo cual es debido a la presencia de microorganismo que producen fitasas, enzimas que favorecen la disponibilidad de fuentes minerales, incluyendo al zinc (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

Los polisacáridos presentes en el pulque son los responsables de que el producto sea considerado también como un prebiótico, a los cuales se les atribuye propiedades antitumorales, inmunoreguladores y depresores del colesterol (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2017).

2.4 TECNOLOGÍA DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS.

Esta tecnología tiene como objetivo separar, purificar y concentrar algún componente del líquido a procesar. Ha sido de interés dados los aspectos favorables que ha presentado en la concentración de productos con compuestos fenólicos, considerando las bajas temperaturas con las que opera y el consumo mínimo de energía que presenta. La separación por membranas está basada en el principio de la dispersión selectiva de solutos a través de una membrana porosa polimérica o inorgánica (Khemakhem *et al.*, 2017).

Dentro de la separación por membranas encontramos a la ósmosis inversa y la ultrafiltración, la diferencia entre ambos es que en la primera se suelen retener moléculas de bajo peso molecular, mientras que en la ultrafiltración se retienen moléculas de pesos moleculares más elevados. También dentro de esta tecnología se encuentra la microfiltración y la nanofiltración (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005). Es así que la clasificación de separación por membranas, de acuerdo a la selectividad de moléculas, se puede visualizar en la siguiente ilustración.

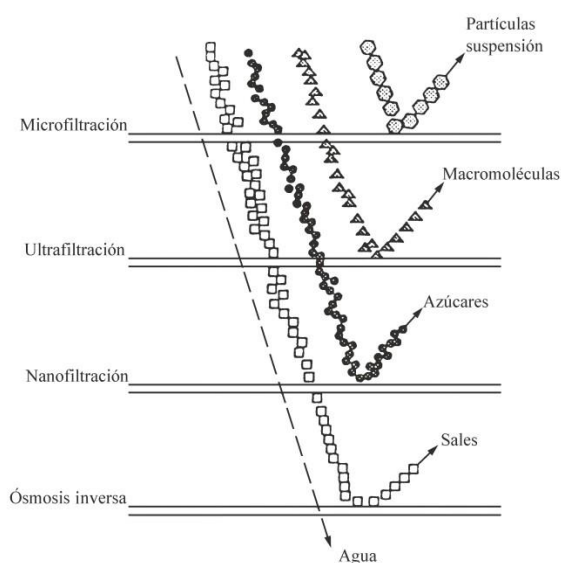


Ilustración VIII. Clasificación de la separación por membranas (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

Independientemente del tipo de separación, durante el proceso se introduce al equipo una alimentación F con una cierta concentración C_0 , de la cual una parte es permeada a través

de la membrana, obteniéndose así una corriente que se llama **permeado** (P) con una determinada concentración C_p . Cierta proporción de F no pasará a través de la membrana, dando así una tercera corriente de **retenido** (S), la cual también tendrá una determinada concentración C_s (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005). Este proceso se puede visualizar en el siguiente esquema.

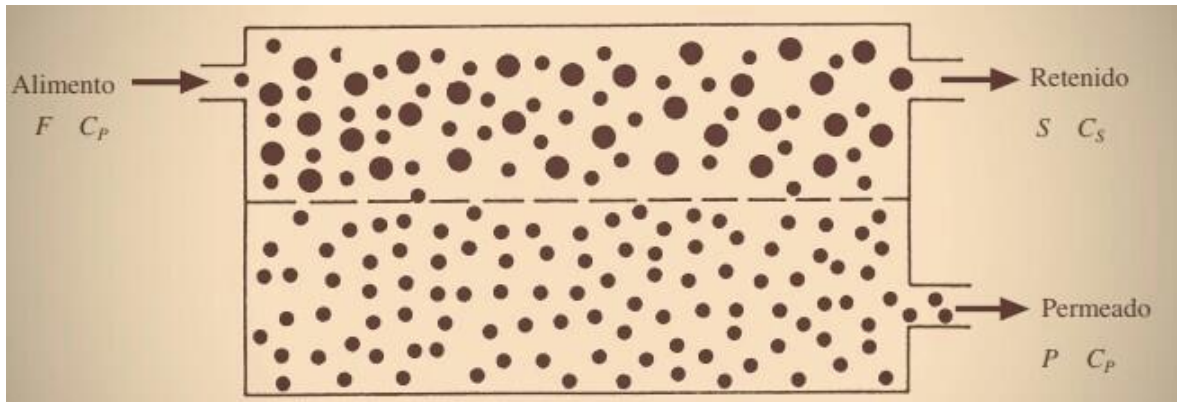


Ilustración IX. Corrientes de entrada y salida durante un proceso de separación por membranas (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

2.4.1 Microfiltración

La microfiltración es utilizada como un pretratamiento para remover sólidos suspendidos, polisacáridos, desechos celulares y otros componentes que pueden estar presentes en la solución a tratar, los cuales por lo general no pueden ser eliminados con un método común de filtración (Destro-dos-Santos *et al.*, 2016).

En la industria de las bebidas, la microfiltración es utilizada para lograr una estabilidad biológica e inclusive para esterilizar. Los microfiltradores presentan un poro menor a $0.65 \mu\text{m}$, siendo utilizados para remover bacterias, levaduras y otros microorganismos que se encuentran en la solución, es así que se elimina lo que un proceso de pasteurización efectúa, de tal manera que se le suele llamar “Pasteurización en frío” (Zeman y Zydney, 1996).

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

El proyecto inicio con satisfacer las necesidades de un productor en Tlaxcala, dueño de la empresa PULMEX, quien pretendía comercializar pulque en otros estados, así como el aguamiel, que considera como curativo. El desplazar ambos productos fuera de su zona de origen o inclusive fuera de su fuente de origen como es el caso del aguamiel, es más que imposible, tomando en cuenta la carga microbiana nativa de estos productos (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007) quienes efectuaran los procesos fermentativos de manera espontánea. Es así que el producto al llegar a su destino presentará características sensoriales diferentes con respecto a las que hicieron que el cliente tomará la decisión de compra. Aprovechando el equipamiento de la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, se le dio la alternativa a PULMEX de someter los productos de su interés a un proceso de separación por membranas. Años más tarde, un productor de pulque, de una región aledaña a la institución, solicita a la universidad un método de conservación de la bebida fermentada que procesa, dado que presentaba excedentes de producción, que le eran imposible de desplazar y como consecuencia del proceso fermentativo, el producto cambiaba sus características sensoriales día con día.

Es así que en el presente proyecto se presentan los resultados obtenidos de la microfiltración, tecnología de separación por membranas utilizada, en aguamiel y pulque de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala y de la bebida fermentada de la región de Zozutla, Yehualtepec-Puebla.

Es claro que para ambos productores ha resultado rentable comercializar pulque, a pesar de la competencia a la que se enfrentan con respecto al consumo de otras bebidas alcohólicas, tal como lo reporta Ortiz-Basurto *et al.* (2008) quienes establecen que de acuerdo a información del 2005, el consumo de pulque decreció críticamente en comparación con el de la cerveza, el cual se calculó en un 54%, mientras que la savia fermentada presentó un valor igual a 11%, situación que desmotivó a los productores de dicha bebida. Para 2008, se reporta que el 51% de consumidores rurales de bebidas alcohólicas ingieren pulque, comparado con un 29% de consumidores urbanos, aunque esta información podría considerarse incierta (Escalante y Gosset, 2008). A pesar de estas cifras, aún hay productores que quieren seguir manteniendo vivo el consumo de este producto

ancestral, el cual en la primera mitad del siglo XX, era considerado como un negocio rentable en México, mientras que para el 2005 su precio fue de US\$0.26 a 0.43 por litro (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008). Actualmente el costo de la bebida en la región de Zozutla es de \$10.0 por litro, lo cual resulta interesante para un productor considerando que el precio podría ser de US\$200.0 o mayor, de acuerdo a la tasa de cambio que presenta el dólar, más sin embargo el enviar pulque a exportación, sin ningún tratamiento, no se garantizaría la calidad e inclusive la inocuidad del mismo, es así que el enlatado fue una opción, más sin embargo sus características sensoriales son muy diferentes dado el tratamiento térmico al cual es sometido, lo que la microfiltración podría abatir, tomando en cuenta que es utilizada en vino y cerveza de barril, bebidas que conservan sus propiedades de sabor a pesar de ser filtrados por este tipo de sistema, dado que este tratamiento en la industria, es utilizado para lograr una estabilidad biológica e inclusive para esterilizar el producto en frío (Zeman y Zydney, 1996), pudiendo aún preservar ciertas características bioactivas que no son retenidas en la membrana que se utiliza en este tipo de tecnología, dados los resultados reportados por Khemakhem *et al.* (2017).

***CAPÍTULO IV.
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

4.1 HIPÓTESIS

La hipótesis de investigación para el presente trabajo es la siguiente:

El tratamiento de microfiltración disminuirá la carga microbiana del pulque y aguamiel, de tal manera que se pueda usar este medio como una técnica de conservación y así detener el proceso fermentativo de ambos productos manteniendo sus características fisicoquímicas iniciales.

4.2 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto es el siguiente:

Elaborar alternativas de consumo derivados de maguey mediante la microfiltración de aguamiel y pulque de los estados de Puebla y Tlaxcala, para evaluar el efecto que tiene esta tecnología sobre las características de dichos productos.

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Los objetivos específicos para el desarrollo del proyecto se enlistan a continuación:

- Caracterización de aguamiel de las dos regiones de estudio, sin microfiltración y ya procesado.
- Formular bebidas a partir de productos microfiltrados.
- Evaluar la aceptabilidad general de productos elaborados.

***CAPÍTULO V.
MATERIALES Y MÉTODOS***

5.1 MATERIA PRIMA.

Las muestras fueron obtenidas de dos lugares: Nanacamilpa de Mariano Arista, municipio localizado al poniente del estado de Tlaxcala, ubicado a 19° 29' latitud norte y 98° 32' latitud oeste, presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano y una temperatura promedio anual de 22°C (INAFED, 2016). Zozutla, región de donde también se procesaron muestras, es una comunidad perteneciente al municipio de Yehualtepec en el estado de Puebla, localizada a una latitud igual a 18°, 45', 18'' y a una longitud de 97°, 39', 3'', con una altura de 2030 m, caracterizada por un clima templado, subhúmedo y una temperatura media anual de 16 a 18 °C (UMR, 2005).

Tomando en cuenta lo planteado en el capítulo IV, para el caso de Nanacamilpa, se microfiltró tanto pulque como aguamiel y para la región de Zozutla solo se procesó pulque. Las muestras de cada lugar presentan características específicas, mismas que se establecerán a continuación.

5.1.1 Nanacamilpa de Mariano Arista.

El aguamiel y pulque de Nanacamilpa proceden de *Agave salmiana* de la variedad denominada maguey manso. Las muestras fueron proporcionadas por la empresa PULMEX. La savia era colectada por la tarde para posteriormente congelarse y así transportarse en hieleras al día siguiente a la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, lugar donde se caracterizó y procesó. El pulque, también era congelado para ser transportado a la zona de estudio, presentando un tiempo de fermentación mayor a 24 horas.

Las muestras de aguamiel y pulque fueron colectadas durante los meses de septiembre a noviembre de 2013, llevando a cabo tres corridas a lo largo de este periodo, efectuando determinaciones por triplicado en cada una.

5.1.2 Zozutla.

En el caso de esta región, el pulque procede de la fermentación de savia colectada de *Agave mapisaga* blanco y maguey Orospeño, denominado así regionalmente. La bebida fue

proporcionada por un productor, quien llevaba las muestras a la institución de estudio a temperatura ambiente.



Ilustración X. *Agave mapisaga* blanco en plena producción de aguamiel.



Ilustración XI. Maguey denominado regionalmente orospeño.

El pulque de esta región contaba con un tiempo de fermentación de 24 horas, correspondiente a la producción de los meses de mayo a agosto del 2015, llevando a cabo también tres corridas, en donde se efectuaban las determinaciones por triplicado. El

proceso de elaboración que se lleva a cabo en esta región, se puede visualizar en la Ilustración XII.



Ilustración XII. Proceso de elaboración de pulque en la región de Zozutla: Extracción de aguamiel **(a)**, Raspado de coco **(b)**, Adición de inoculo a tina de fermentación **(c)**, Mezclado de inoculo **(d)**, Adición de aguamiel a tina de fermentación **(e)** y Separación de pulque de la semilla, posterior al proceso de fermentación **(f)**.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTO.

5.2.1 Aguamiel.

Las determinaciones fisicoquímicas efectuados fueron las siguientes:

- **Sólidos solubles totales (SST).** Prueba que se realiza colocando una muestra de aguamiel sobre el cristal de un refractómetro ATAGO 3840, con una escala de 0-30, expresando el resultado en grados Brix (°Bx) (AOAC, 1990).
- **pH.** Se utilizó un potenciómetro CONDUCTRONIC PH 10, calibrado con soluciones Buffer a dos puntos (4.0 y 7.0), realizando la medición directamente sobre la muestra (AOAC, 1990).

Las determinaciones microbiológicas que se llevaron a cabo fueron con diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} , determinando los siguientes grupos de microorganismos:

- **Bacterias Mesófitas Aerobias.** La identificación de estos microorganismos se realizó siguiendo la metodología establecida en la NOM-092-SSA1-1994: BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.
- **Mohos y levaduras.** Se determinó según la NOM-111-SSA1-1994: BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.
- **Coliformes totales.** La metodología usada para este caso es la que se plantea en la NOM-112-SSA1-1994: BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.

Las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas fueron efectuadas tanto para aguamiel sin tratamiento y microfiltrado, llevándose a cabo el mismo día de la recepción de materia prima.

5.2.2 Pulque.

En este caso se evaluó SST, pH, densidad y contenido alcohólico. La determinación de las primeras dos variables se hizo siguiendo la misma metodología ya descrita con anterioridad. La densidad y el contenido alcohólico se determinaron utilizando las siguientes técnicas:

- **Densidad.** Determinación que se efectuó por método gravimétrico, la cual consiste en poner a peso constante un picnómetro de 100 mL (V), para posteriormente registrar su peso (P₁), utilizando en este caso una balanza marca VELAB, modelo VE-300 con una aproximación de 0.001 g y capacidad para 300 g. Se vierte el pulque dentro del material, llenándose en su totalidad para finalmente ser tapado, limpiando los residuos que hayan salido por el desplazamiento al introducir el tapón. Se registra el peso del picnómetro lleno (P₂) y se determina el valor de densidad con la ecuación 1.

$$\rho = \frac{P_2 - P_1}{V} \quad (1)$$

- **Contenido alcohólico.** Es adicionado a una probeta de 250 mL, 200 mL de pulque, muestra que fue previamente atemperada a 15 °C; posteriormente es sumergido en la probeta un alcoholímetro (F, Mantey B., México) de escala 0-20° G.L., realizando la lectura directa con respecto a la posición del menisco.

Se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias a través de la prueba T de Student para grupos independientes para cada una de las variables fisicoquímicas y microbiológicas del producto sin y con microfiltrado. El análisis estadístico se realizó a través del programa SAS (versión 9.4.).

5.3 MICROFILTRACIÓN.

Como etapa de acondicionamiento a la microfiltración, tanto el aguamiel como el pulque, son filtrados haciéndose pasar por un cedazo de tela. La operación unitaria se efectúa con un microfiltrador tangencial, perteneciente a la Universidad Tecnológica de Tecamachalco, Puebla, México. El equipo consta de un módulo de cuatro membranas con una longitud de 1.0 m. Las membranas son de cerámica con tamaño de poro de 0.2 μm (Pal Systems, EE.UU.). El aguamiel o pulque es suministrado y filtrado tangencialmente con una bomba de desplazamiento positivo Tipo K 1305 Inoxpa (México), que alimenta a una bomba centrífuga motor trifásico Q pump Standard Sanitary (México). El equipo de microfiltración se manejó con un volumen mínimo de 60 L, el cual se alimenta a una presión de 2 kg/cm^2 .

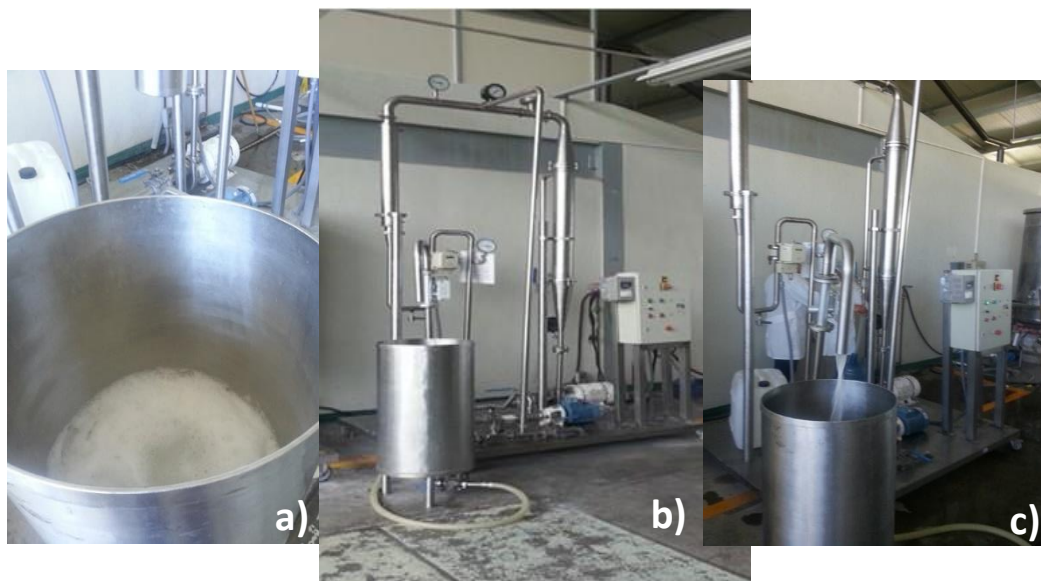


Ilustración XIII. Sistema de microfiltración: Reservorio con pulque **(a)**, Vista completa del equipo **(b)** y Sistema en funcionamiento **(c)**.

Previo al uso del equipo y posterior al procesamiento debe de realizarse un lavado, aplicando inicialmente un detergente ácido, posteriormente un enjuague con agua, después otro lavado con un detergente alcalino a una temperatura de 70°C, continuando con otro enjuague con agua y finalmente la circulación de sanitizante.

5.4 FORMULACIÓN DE BEBIDAS.

Haciendo uso de aguamiel y pulque microfiltrado se desarrollaron las bebidas, La elaboración consiste en un proceso bastante sencillo pero se requiere realizar en condiciones asépticas para conservar la inocuidad del producto, por lo que la etapa de mezclado, que es donde se incorporan los ingredientes, se realiza en una campana de flujo laminar SEV Lab, modelo CFL 102.

A petición de la empresa PULMEX, la bebida a partir de aguamiel microfiltrado se desarrolló en tres sabores: horchata, durazno y pistache, efectuando dos variantes para cada una, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla III. Formulación de bebidas a partir de aguamiel microfiltrado.

Ingrediente	Porcentaje					
	Bebida sabor horchata		Bebida sabor a durazno		Bebida sabor a pistache	
	F1H	F2H	F1D	F2D	F1P	F2P
Aguamiel microfiltrado	89.7	93.9	96.2	98.5	96.7	97.7
Saborizante con color	10.0	5.9	3.5	1.2	2.8	1.9
Conservador	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

F1H: Formulación uno sabor horchata, **F2H:** Formulación dos sabor horchata, **F1P:** Formulación uno sabor a pistache, **F2P:** Formulación dos sabor a pistache **F1D:** Formulación uno sabor a durazno y **F2D:** Formulación dos sabor a durazno.

Los sabores de las bebidas de pulque microfiltrado de Nanacamilpa, también se desarrollaron a partir de la preferencia de la empresa, tomando en cuenta los sabores que PULMEX vende más en los expendios donde comercializa curados y pulque natural. Para el caso de Zozutla, se le sugirió al productor los mismos sabores que Nanacamilpa y proponiéndole un sabor alternativo, de tal manera que las formulaciones se efectuaron tal como se muestra en las siguientes tablas.

Tabla IV. Formulación de bebidas a partir de pulque microfiltrado procedente de Nanacamilpa.

Sabor	Ingredientes (%)			
	Pulque microfiltrado	Edulcorante	Saborizante	Agente espesante
Nuez	95.2	2.4	2.3	0.1
Piña-Coco	91.5	6.8	1.6	0.1

Tabla V. Formulación de bebidas a partir de pulque microfiltrado procedente de Zozutla.

Sabor	Ingredientes (%)			
	Pulque microfiltrado	Edulcorante	Saborizante	Concentrado de coco
Nuez	94.4	5.5	10.0	-----
Café	93.0	6.5	46.0	-----
Piña-Coco	75.0	3.0	1.5	20.5

5.5 DETERMINACIÓN DE NIVEL DE AGRADO DE BEBIDAS DESARROLLADAS

Cada una de las bebidas fue evaluada mediante una prueba de aceptación, denominada escala hedónica de nueve puntos, donde 1 se refiere al criterio “Me disgusta muchísimo” y 9 corresponde a “Me gusta muchísimo”. Las pruebas fueron efectuadas por 25 consumidores, a quienes se les preguntaba si gustan de tomar bebidas alcohólicas, evaluando el nivel de agrado del producto.

Las muestras eran servidas en vasos de plástico transparente no. 00 (1 onza), presentando una temperatura promedio de 4 °C al momento de servirse, llevándose a cabo en las instalaciones del edificio del Programa Educativo de Procesos Alimentarios de la Universidad Tecnológica de Tecamachalco.

La evaluación sensorial se llevó a cabo en tres etapas, de tal manera que en una se evaluaron las seis formulaciones de aguamiel, en la siguiente las dos bebidas desarrolladas a partir de pulque microfiltrado procedente de Nanacamilpa y en la otra se incluyeron los tres productos de bebida fermentada de la región de Zozutla, de tal manera que cada prueba se realizó por jueces distintos.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente efectuando una ANOVA de un solo factor por comparaciones múltiples de Tukey, haciendo uso de Minitab 16.

CAPÍTULO VI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 MICROFILTRACIÓN DE AGUAMIEL.

En la tabla VI se muestran los resultados de la caracterización de aguamiel obtenido de Nanacamilpa, Tlaxcala, así como los valores resultantes de la savia ya procesada en el sistema de microfiltración.

Tabla VI. Características de aguamiel de maguey manso de la región de Nanacamilpa, Tlaxcala.

Parámetro	Resultados	
	Sin tratamiento	Microfiltrado
Sólidos solubles totales (°Bx)	12.1 ± 1.4 ^a	11.0 ± 0.1 ^a
pH	6.0 ± 0.4 ^b	5.3 ± 0.0 ^b
Bacterias Mesófilas aerobios (UFC/mL)	> 250 ^c	< 10 ^d
Mohos y levaduras (UFC/mL)	> 150 ^e	< 10 ^f
Coliformes totales (NMP/100mL)	9.2 ^g	< 1.1 ^h

Valores seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). Valores medios ± desviación estándar (n=9). **UFC:** Unidad Formadora de Colonia. **NMP:** Número más probable.

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos, la savia de maguey de Nanacamilpa, no entra dentro de la clasificación establecida por la norma NMX-V-022-1972, tanto por el contenido de pH como SST. Muñoz *et al.* (2015), reportan un valor de 10.60 °Brix ± 0.10 para jarabe de *Agave salmiana* proveniente de la localidad de Mangas en Saltillo, Coahuila, valor que difiere con el obtenido en este estudio (12.10 °Brix ± 1.4), a pesar de pertenecer a la misma variedad.

Existen muchas variantes que pueden estar ocasionando esta diferenciación, por ejemplo, las características de la savia van cambiando de acuerdo al tiempo de producción, detectado por Ortiz-Basurto *et al.* (2008) a partir de un estudio de aguamiel de *Agave mapisaga* blanco de la región de Lomas de Romero, Tecamachalco-Puebla, donde los resultados de SST fueron disminuyendo a través del tiempo de producción del aguamiel.

El valor de pH obtenido (6.0 ± 0.4) es equiparable con lo reportado por Escalante *et al.* (2008), quienes muestran un valor igual a 6.0 de una muestra recién colectada de la región de Morelos, esto hace referencia de que a pesar de haber transportado el producto, el proceso de congelación detuvo hasta cierto grado la fermentación del mismo e incluso

dicho parámetro se mantuvo constante después del proceso de microfiltración, así como el contenido de SST, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico efectuado.

Los parámetros microbiológicos para savia, demostraron que la solución azucarada sin tratamiento es un nicho importante de bacterias mesófilas, así como mohos y levaduras, tal como lo reportó Escalante *et al.* (2008), quienes analizaron muestras de aguamiel de la región de Huitzilac, ubicada en el estado de Morelos, obteniendo 1.3×10^7 UFC/mL para bacterias mesófilas y 3.1×10^4 para el caso de levaduras; las determinaciones de este estudio se efectuaron al realizar diluciones hasta 10^{-6} , mientras que en el presente proyecto sólo se efectuó hasta 10^{-3} , aun así se denota la riqueza microbiológica del aguamiel tal como lo establece Santos-Zea *et al.* (2016), quienes también comentan, que dicha carga microbiana no permite que la bebida se almacene por periodos prolongados, por lo que podemos inferir, dados los resultados microbiológicos obtenidos para los 3 grupos estudiados en el producto tratado, que la microfiltración contrarresta dicho aspecto haciendo que la bebida ya no siga fermentando.

Muñiz-Márquez *et al.* (2015) estiman que la única forma de aprovechar la composición funcional derivada de los componentes bioactivos que contiene el aguamiel, como son aminoácidos libres y azúcares, sólo es inmediatamente después de efectuar la recolección de la bebida, de tal manera que ahora el producto tratado podría ser aún el vehículo de los componentes bioactivos de interés.

Otra de las ventajas que ofrece la microfiltración es que se evita la reacción de Maillard en esta bebida al ser un proceso en frío, a comparación de un tratamiento térmico que provoca el oscurecimiento en mieles de agave que son sometidas a calor (Muñiz-Márquez *et al.*, 2015), dada la presencia de azúcares reductores (AR), compuestos necesarios para llevar a cabo dicha reacción y que están presentes en la savia de maguey, tal como lo reporta Muñiz-Márquez *et al.* (2015) quienes obtuvieron un contenidos de AR para aguamiel de *Agave salmiana* igual a $32.33 \text{ g/L} \pm 2.38$.

6.2 MICROFILTRACIÓN DE PULQUE

Los cambios ocurridos en el pulque al momento de ser microfiltrado se observan en la tabla VII.

Tabla VII. Caracterización de pulque de la región de Nanacamilpa, Tlaxcala y Zozutla, Yehualtepec, Puebla sin tratamiento y microfiltrado.

Parámetros evaluados	Resultados promedio			
	Nanacamilpa		Zozutla	
	Sin tratamiento	Microfiltrado	Sin tratamiento	Microfiltrado
Sólidos solubles totales (°Bx)	3.2 ± 0.3 ^a	3.0 ± 0.0 ^b	5.0 ± 0.0 ^c	4.0 ± 0.0 ^d
pH	3.4 ± 0.2 ^e	3.2 ± 0.3 ^{f g}	3.6 ± 0.1 ^g	3.5 ± 0.1 ^g
Densidad a 20°C (kg/cm ³)	994 ± 4.0 ^h	990 ± 3.0 ^{h i}	987 ± 6.0 ^{i j}	980 ± 0.0 ^j
Contenido alcohólico (% V/V)	2.9 ± 0.2 ^k	3.0 ± 0.0 ^k	3.9 ± 0.1 ^l	3.8 ± 0.1 ^l
Mesófilos aerobios (UFC/mL)	173 ± 15 ^m	< 10 ⁿ	123 ± 4 ^o	< 10 ⁿ
Mohos y levaduras (UFC/mL)	510 ± 41 ^p	< 10 ^q	430 ± 35 ^r	< 10 ^q
Coliformes totales (NMP/100mL)	< 1.1 ^s	< 1.1 ^s	< 1.1 ^s	< 1.1 ^s

Valores seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). Valores medios ± desviación estándar (n=9). **UFC:** Unidad Formadora de Colonia. **NMP:** Número más probable.

Para las muestras sin microfiltrar de ambas regiones, el contenido alcohólico difiere con lo reportado por Gómez-Aldape *et al.* (2012), quienes indican un valor igual a 5.4%, mientras que Rivera-Vargas *et al.* (2016) mencionan que las bebidas suaves contienen 6 °G.L. y para pulques fuertes el contenido es igual a 20 ° G. L. por su parte, Muñiz-Márquez *et al.* (2015), establecen que el pulque puede presentar un contenido alcohólico de 3 a 6%, rango al que se acercan las muestras de Nanacamilpa y que coinciden con las de Zozutla. Definitivamente esta diversidad de valores, permite vislumbrar la falta de estandarización en el procesamiento de pulque o inclusive que esta propiedad es peculiar para cada zona o característica para cada productor.

Considerando la normativa mexicana NMX-V-022-1972, que sería una forma de evitar la disparidad de valores, el pulque de ambos lugares de estudio entra en la clasificación de tipo II, de acuerdo al contenido alcohólico, denominándose como pulque comercial. Sin embargo por el resultado de pH de pulque de Nanacamilpa, éste se clasifica como tipo I, sólo con respecto a este parámetro. La coincidencia con las especificaciones resulta ser

interesante, tomando en cuenta, que el aguamiel, siendo la materia prima de ese producto, no sería apta para la normativa de referencia.

Dentro del análisis estadístico, el contenido etanólico es una de las propiedades que no cambia para las bebidas de ambas regiones después de haber sido tratadas, favoreciendo así una de las propiedades que las hacen ser bebidas alcohólicas.

Los resultados microbiológicos de muestras sin tratamiento, demuestran que la carga microbiana mesófila aerobia es menor en comparación con el contenido de levaduras, lo cual es notable tanto en las muestras de Zozutla y Nanacamilpa, municipio que resultó tener un nicho mayor significativamente para ambos grupos de microorganismos. Sin embargo de manera general los contenidos disminuyeron con respecto a la proporción obtenida en aguamiel (Tabla VI), reducción que se puede estar originando dado que la carga microbiana inicial no soporta las condiciones de pH y contenido alcohólico del medio (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2007; Escalante *et al.*, 2008).

Comparando los resultados microbiológicos de pulque con los de Escalante *et al.* (2008), quienes obtuvieron, para muestras fermentadas durante 6 horas, un contenido de bacterias mesófilas aerobias igual a 3.5×10^7 UFC/mL y 1.4×10^7 UFC/mL para el caso de levaduras, las cuales fueron inicialmente (aguamiel) de 3.1×10^4 UFC/mL, donde es evidente que el periodo de fermentación es menor con respecto a las muestras analizadas y tomando en cuenta que al paso del tiempo hay una disminución de pH y un aumento en la proporción de alcohol, se reafirma la idea de la inhibición microbiana por parte de la concentración de estos compuestos.

Con respecto a los valores en muestras tratadas, se determinan varias ventajas del método aplicado, una de ellas es que el producto no se obscurece, evitando así que se lleve a cabo la reacción de Maillard, lo cual produce melanoidinas que dan un color pardo a productos que son tratados térmicamente (Ver ilustración XIV, inciso c), siempre y cuando existan azúcares reductores y grupos amino, los cuales son característicos de este tipo de producto, tal como lo reporta Escalante *et al.* (2008) debido a que muestras de pulque fermentadas después de seis horas tuvieron un valor de fructosa igual 12.43 mM y 3.82 mM de glucosa.

En contraparte del tratamiento mencionado, la tecnología de separación por membranas utilizada proporciona un producto de color translucido, resultado característico de un proceso de microfiltración, tal como lo reporta Destro-dos-Santos *et al.* (2016) quienes estudiaron la clarificación de remolacha roja por medio de microfiltración combinado con ultrafiltración, reduciendo el valor de turbidez al ser microfiltrada de 4408 NTU a 20.7 NTU (Unidades Nefelométricas), utilizando una membrana de cerámica con tamaño de poro menor ($0.05\ \mu\text{m}$) al del presente: el proceso de clarificación es evidente dadas las características natas del pulque en cuanto a su turbiedad, sin presentar un color caramelo como si fuese tratado térmicamente.

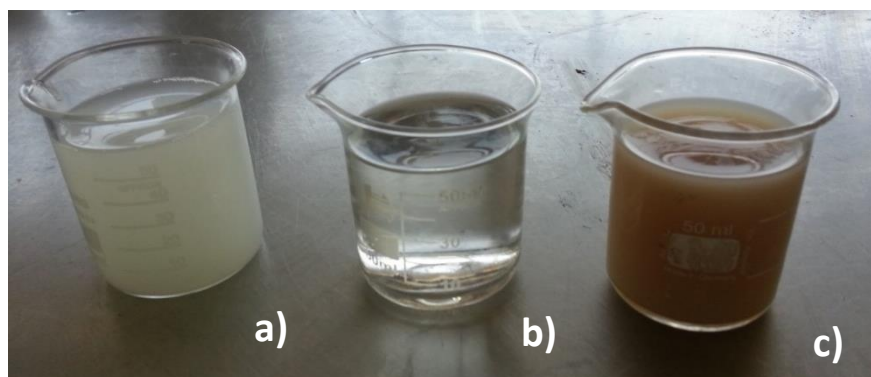


Ilustración XIV. Pulque sin tratamiento **(a)**, Pulque microfiltrado **(b)** y Pulque tratado térmicamente **(c)**.

Con respecto al sabor y olor del producto, estas características perduran en la bebida microfiltrada, situación similar que en el aguamiel tratado. Dada la permanencia de estas propiedades sensoriales, la cerveza de barril es microfiltrada, tecnología que presenta la gran ventaja de que dicho producto, a pesar de ser procesado, no pierde su sabor (Zeman y Zydney, 1996), aspecto que para este proyecto requiere equipararse con una evaluación sensorial, dado que el contenido de SST y pH fueron modificados al tratar el producto, a excepción del valor de potencial de hidrógeno para la región de Zozutla, donde no hubo un cambio significativo estadísticamente.

La microfiltración para ambos productos estudiados, logra bebidas estériles, lo cual para efectos de la conservación es favorable, evitando así que sigan fermentando y conserven

sus propiedades por un tiempo determinado, sopesando así el riesgo de consumirlos, tomando en cuenta las condiciones no asépticas en las que se procesan, tanto en cuestión de infraestructura como del personal que se encarga de la elaboración (Gómez-Aldape *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2008).

Siguiendo con el aspecto de inocuidad de los productos microfiltrados, en las tres determinaciones efectuadas por triplicado de las muestras de pulque, estas siempre presentaron resultados favorables con respecto al contenido de coliformes totales, grupo microbiano dentro del cual se encuentran los coliformes fecales, como es *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., microorganismos que no pueden sobrevivir a las condiciones de pH y contenido alcohólico de la bebida, tal como se demostró en un estudio donde se adicionaron *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, las cuales fueron eliminados dados los resultados microbianos finales en muestras de pulque (Gómez-Aldape *et al.*, 2012).

Sin embargo, se ha identificado que *E. coli* 0157:H7 puede sobrevivir en la bebida alcohólica, a pesar de sus características fisicoquímicas (Gutiérrez-Urbe *et al.*, 2007), situación que ya no es un riesgo en la bebida procesada, dada la eliminación de microorganismos al que pertenece esta bacteria. Inclusive la microfiltración ha llegado a sustituir la pasteurización en el procesamiento de vino blanco, alargando la vida útil de esta bebida (Zeman y Zydney, 1996).

A pesar de que el aguamiel y el pulque microfiltrado resulten seguros para su consumo, se está en el entendido de que la parte bioactiva de ambos productos es afectada al aplicar esta tecnología. Sin embargo, en el permeado todavía podría quedar una cierta composición de interés, dado que de acuerdo a Khemakhem *et al.* (2017), quienes evaluaron el contenido de ciertos compuestos funcionales en un extracto de hojas de oliva utilizando una membrana con la misma apertura de poro que para este estudio, encontraron que el producto microfiltrado contiene $182.19 \text{ mg}_{\text{oleuropeína}}/100\text{g}_{\text{extracto}} \pm 1.87$ para fenoles totales, con una composición inicial de $289.57 \text{ mg}_{\text{oleuropeína}}/100\text{g}_{\text{extracto}} \pm 3.16$ y para el caso de flavonoides se obtuvo $128.45 \text{ mg}_{\text{rutina}}/100\text{g}_{\text{extracto}} \pm 0.17$ en el permeado, con

un contenido inicial de $180.92 \text{ mg}_{\text{rutina}}/100\text{g}_{\text{extracto}} \pm 1.64$. Como se puede observar, ambos componentes no fueron retenidos en su totalidad en la membrana, lo que significa que para el pulque y aguamiel podría ser el mismo caso, tomando en cuenta también que propiamente la microfiltración tiene por objetivo principal remover la carga microbiana del fluido, a diferencia de la ultrafiltración que remueve proteínas, coloides suspendidos, compuestos polifenólicos, almidón, pectina y microorganismos, aplicándose esta operación unitaria en jugo de frutas (Zeman y Zidney, 1996).

6.3 RESULTADOS DE NIVEL DE AGRADO.

6.3.1 Bebida a partir de aguamiel microfiltrado.

En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de bebidas a partir de aguamiel microfiltrado del municipio de Nanacamilpa, tomando en cuenta que para cada sabor se realizaron dos variaciones.

Tabla VIII. Resultados de aceptabilidad general de formulaciones desarrolladas a partir de aguamiel microfiltrado del municipio de Nanacamilpa.

Formulación	Aceptabilidad general	Ingredientes (%)
F2H	8.2 ± 0.7 ^a	93.9 AMM, 5.8 SABCC
F2D	7.7 ± 0.7 ^a	98.5 AMM, 1.2 SABCC
F2P	7.8 ± 0.9 ^a	97.7 AMM, 1.9 SABCC
F1H	7.5 ± 0.9 ^{ab}	89.7 AMM, 10.0 SABCC
F1P	6.9 ± 0.9 ^b	96.7 AMM, 2.8 SABCC
F1D	6.88 ± 1.166 ^b	96.2 AMM, 3.5 SABCC

Valores seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). **AMM:** Aguamiel microfiltrado, **SABCC:** Saborizante con color, **F1H:** Formulación uno sabor horchata, **F2H:** Formulación dos sabor horchata, **F1P:** Formulación uno sabor a pistache, **F2P:** Formulación dos sabor a pistache, **F1D:** Formulación uno sabor a durazno y **F2D:** Formulación dos sabor a durazno. Todas las bebidas tienen un contenido de conservador igual al 0.3%.

La bebida que presentó una mejor aceptación fue la F2H, con un nivel de agrado igual a 8.2 ± 0.7, la cual a pesar de ser el más alto no mostró diferencia significativa con respecto a la formulación del mismo sabor que contiene menor proporción de aguamiel microfiltrado, situación que no se presenta en las formulaciones de durazno y pistache, donde si existe una significancia con respecto al contenido de aguamiel microfiltrado, siendo las formulaciones con mejor puntuación aquellas que presentan un porcentaje ligeramente mayor de este ingrediente.

Durante el estudio de bebidas lácteas con diferentes concentraciones de suero, se obtuvo que la puntuación para las mejores fue de 6.4 (20% suero) y 7.0 (35% suero), mismas que no presentaron diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Castro

et al., 2012). Los resultados obtenidos en el presente proyecto oscilan entre los reportados por dicho artículo e inclusive superan la puntuación máxima obtenida.

6.3.2 Bebida a partir de pulque microfiltrado.

En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos para las bebidas de pulque tratado tanto de la región de Zozutla como del municipio de Nanacamilpa.

Tabla IX. Resultados de aceptabilidad general de formulaciones desarrolladas a partir de pulque tratado del municipio de Nanacamilpa y la región de Zozutla.

Sabor de la bebida	Nivel de agrado	
	Nanacamilpa	Zozutla
Nuez	6.3 ± 2.3 ^a	5.7 ± 2.4 ^a
Café	N/A	5.9 ± 2.3 ^{a b}
Piña-Coco	5.7 ± 1.7 ^a	7.4 ± 2.1 ^b

Valores seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). N/A: No aplica.

Los resultados demuestran que las muestras de Nanacamilpa sabor nuez son las de mejor agrado, sin embargo, estas no presentan significancia con respecto a las de piña-coco. En el caso de las formulaciones para pulque tratado de Zozutla, la bebida con nivel de agrado mayor fue la de piña-coco, seguida por el sabor café, mismas que entre sí, no tienen diferencia significativa, a excepción del sabor nuez, la cual presentó un nivel de agrado menor y estadísticamente es diferente a la formulación de piña-coco.

Es interesante denotar que para las regiones fueron adversos los resultados, dado que para Zozutla la formulación con un nivel de agrado mayor fue la de piña-coco, a la cual se le adicionó una proporción menor de pulque microfiltrado (75%) y un concentrado de coco (20.5 %), mientras que la de Nanacamilpa sólo se adiciona saborizante (1.6%), una proporción mucho mayor de pulque microfiltrado (91.5%) y no se hace uso de concentrado, lo cual puede estar marcando la diferencia con los niveles de agrado obtenidos, así como en las muestras de nuez donde el ingrediente microfiltrado se adiciona en 95.2 % y 94.4% para Nanacamilpa y Zozutla respectivamente, con una diferencia considerable entre el

contenido de edulcorante (2.4 %) y saborizante (2.3 %) para la bebida desarrollada a partir de muestras del estado de Tlaxcala, proporciones que son menores en comparación de la otra región, donde se utilizó un contenido mayor de los dos ingredientes antes mencionados (5.5 % de edulcorante y 10% de saborizante).

De manera general la puntuación obtenida para todas las bebidas es mayor comparada con el resultado obtenido en un estudio de bebida fermentada elaborada a partir de malta con una determinada variedad de levadura, la cual obtuvo 5.33 ± 0.51 , siendo ésta la que obtuvo la mejor puntuación con respecto a otras ocho formulaciones desarrolladas y considerándose como un resultado que arroja un sabor aceptable (Salmerón *et al.*, 2015). A diferencia de este estudio, Salgado *et al.* (2016) obtuvieron un rango de puntuación de 5.32 a 5.68 para muestras de vino blanco, de las cuales dos fueron nanofiltradas, detectando que el método de tratamiento no tiene efecto sobre las muestras tratadas y que las bebidas estudiadas son ligeramente aceptadas, considerando los valores de la escala hedónica, clasificación en la que se encuentran la mayoría de las formulaciones desarrolladas a excepción de la bebida de piña-coco de Zozutla y nuez de producto tratado de Nanacamilpa, las cuales están por arriba de dicha puntuación.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN

Después de haber microfiltrado las muestras de aguamiel y pulque de las diferentes zonas de estudio, se puede establecer que la hipótesis planteada se cumple parcialmente, puesto que para el aguamiel y pulque la microfiltración resulta ser una tecnología de conservación dada la disminución de carga microbiana de estos productos. En cuanto a las características fisicoquímicas, para el caso de aguamiel, el tratamiento aplicado, no tuvo efectos sobre estos parámetros para la bebida fermentada, pero si hubo cambios en el contenido de SST para muestras de ambas regiones, lo cual para efectos de este proyecto, no resulta ser un problema, porque esta composición se puede estandarizar con la adición del edulcorante que se agrega a la bebida desarrollada.

La formulación que se sugiere elaborar para el caso de aguamiel microfiltrado, es el sabor horchata con un porcentaje de AMM mínimo igual a 89.7%, para el caso de durazno y pistache, habrá que adicionar una proporción igual a 98.5% y 97.7%, respectivamente, menor a estos porcentajes no se recomienda, siempre y cuando se quiere tener niveles de aceptación mayores a 7.0. Para el caso de las bebidas de pulque tratado, se considera usar las formulaciones de piña-coco y café, aplicadas a las muestras de Zozutla y en el caso del sabor nuez, es recomendable usar la proporción de ingredientes establecidos para las muestras de Nanacamilpa.

Este trabajo soporta la idea de que la microfiltración disminuye la carga microbiana de los líquidos procesados por esta tecnología, permitiendo considerar como alternativa de conservación. Sin embargo hay que tomar en cuenta que dentro de la remoción de microorganismos se están eliminando aquellos que son benéficos para el ser humano, mismos que se pueden aislar y volverse a inocular en la bebida, teniendo así que estudiar el comportamiento o efecto que estos tienen en el sustrato adicionado.

Se considera también imprescindible evaluar en posteriores investigaciones si el proceso de microfiltración mantiene los componentes bioactivos que caracterizan tanto al aguamiel como al pulque, los cuales al ser mantenidos a pesar de ser tratado el producto, sopesaría la eliminación de microorganismos benéficos.

Tomando en cuenta la información de la investigación realizada, se denota que el pulque, al igual que otros productos endémicos de nuestro país, les hace falta actualizar regulaciones que garanticen la calidad y seguridad alimentaria de los mismos, y de esta manera, no crear ideas preconcebidas de que el producto mexicano no tiene las mismas características que un producto importado. Así mismo, se recomienda a los productores de Zozutla dar un periodo mayor de madurez entre el capado y la primera recolección de aguamiel, lo cual podría mejorar las características de la savia, esencialmente el contenido de sólidos solubles totales, sustrato necesario para efectuar el proceso fermentativo.

CAPÍTULO VIII.

REFERENCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). ***Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists***. 15th ed. Washington, DC.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). ***Flora medicinal tepehuana del sur de Durango***. Recuperado: 15/11/16.
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Maguey&p=tepehuan_del_sur&id=6054&clave_region=13.
- Bowell-Benjamin, A.C. (2010). ***Capítulo 22: Bioactivity, Benefits and Safety of Traditional and Ethnic Foods***. En Ensuring Global Food Safety. Academic Press: USA. pp: 363-382.
- Castro, W.F.; Cruz, A. G.; Bisinotto, M. S.; Guerreiro, L. M. R.; Faria, J. A. F.; Bolini, H. M. A. (2012). ***Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation***. (Versión electrónica). Journal Dairy Sci. 96: 16-25.
- Cervantes-Contreras, M. y Pedroza-Rodríguez, A.M. (2007). ***El pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman***. (Versión electrónica). NOVA 5(8): 135-146.
- Destro-dos-Santos, C.; Külzer-Scherer, R.; Schilling-Cassini, A.; Ferreira-Marczak, L. D. y Cristina-Tessaro, I. (2016). ***Clarification of red beet stalks extract by microfiltration combined with ultrafiltration***. (Versión electrónica). Journal of Food Engineering 185: 35-41.
- Escalante, A.; Giles-Gómez, M.; Hernández, G.; Córdoba-Aguilar, M.S.; López-Munguía, A.; Gosset, G. y Bolívar, F. (2008). ***Analysis bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach***. (versión electrónica). International Journal of Food Microbiology 124: 126-134.

- Escalante, A. y Gosset, G. (2000). **El pulque, una bebida con un gran pasado y ¿un futuro incierto?, parte II de II.** Academia de Ciencias de Morelos, A. C.: 34-35. Recuperado: 18/11/16. http://acmor.org.mx/descargas/08_jul_28_pulque.pdf
- Gómez-Aldape, C.A.; Díaz-Cruz, C. A.; Villarruel-López, A.; Torres-Vitela, M. del R.; Rangel-Vargas, E. y Castro-Rosas, J. (2012). **Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage.** (Versión electrónica). International Journal of Food Microbiology 154: 79-84.
- Gutierrez-Uribe, J.A.; Figueroa, L.M.; Martín-del-Campo, S.T. y Escalante, A. (2017). **Capítulo 23: Pulque.** En Fermented Foods in Health and Disease Prevention. Academic Press: USA. pp: 543-556.
- Ibarz, A. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). **Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos.** Ediciones Mundi-Prensa: España. pp: 297-301.
- INAFEDD. (2016). **Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México: Nanacamilpa de Mariano Arista.** Recuperado: 18/11/16. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM29tlaxcala/municipios/29021a.html>
- Kherrmakthem, I.; Dridi, G. O.; Dhouib, A.; Ayadi, M. A. y Bouzaziz, M. (2017). **Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration.** (Versión electrónica). Separation and Purification Technology 172: 310-317.
- Moreno-Terrazas, R. (2015). **Genera INIFAP tecnología que aumenta rendimientos y reduce a menos de cinco años la cosecha de agave azul.** Recuperado: 24/11/16. <http://www.agared.org/noticias/genera-inifap-tecnologia-que-aumenta-rendimientos-y-reduce-menos-de-cinco-anos-la-cosecha>.
- Muñiz-Márquez, D.B.; Contreras, J. C.; Rodríguez, R.; Mussato, S. L.; Wong-Paz, J. E.; Teixeira, J. A. y Aguilar, C. N. (2015). **Influence of thermal effect on sugars**

- composition of Mexican Agave syrup.*** (Versión electrónica). CyTA – Journal of Food 13 (4): 607.612.
- NMX-V-022-1972: Aguamiel. Hydromel. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-V-037-1972: Pulque manejado a granel. Pulque handled in bulk. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-112-SSA1-1994: Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- Ortiz-Basurto, R. I.; Pourcelly, G.; Doco, T.; Williams, P.; Dorner, M. y Belleville, M. P. (2008). ***Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (Agave mapisaga) throughout the Harvest Period.*** (Versión electrónica). Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 3682-3687.
- Peña-Álvarez, A.; Díaz, L.; Medina, A.; Labastida, C.; Capella, S. y Vera, L. E. (2004). ***Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry.*** (Versión electrónica). Journal of Chromatography A. 1027: 131-136.
- Rivera-Vargas, G.A.; Matsumoto-Kuwabara, Y. y Baquero-Parra, R. (2016). ***Análisis para la obtención de hidrógeno a partir de biogás proveniente de la fermentación de bebidas naturales.*** (Versión electrónica). Ingeniería Investigación y Tecnología 17(2): 251-256.
- Salgado, C. M.; Fernández-Fernández, E.; Palacio, L.; Carmona, F. J.; Hernández, A. y Prádanos, P. (2016). ***Application of pervaporation and nanofiltration membrane***

- processes for the elaboration of full flavored low alcohol White wines.*** (Versión electrónica). Food and Bioproducts Processing 101: 11-21.
- Salmerón, I.; Thomas, K. y Pandiella, S.S. (2015). ***Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria of the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages.*** (Versión electrónica). Journal of Functional Foods 15:106-115.
- Santos-Zea, L.; Leal-Díaz, A.M.; Jacobo-Velázquez, D.A.; Rodríguez-Rodríguez, J.; García-Lara, S. y Gutiérrez-Urbe, J.A. (2016). ***Characterization of concentrated agave saps and storage effect on browning, antioxidant capacity and amino acid content.*** (Versión electrónica). Journal of Food Composition and Analysis 45: 113-120.
- UMR. (2005). ***San Miguel Zozutla: Ubicación y medio físico.*** Recuperado: 19/11/16. <http://www.microrregiones.gob.mx/cedulas/localidadesDin/ubicacion/relieve.asp?micro=MIXTECA%203&clave=212050007&nomloc=SAN%20MIGUEL%20ZOZUTLA>
- Zeman, L. J. y Zydney, A. L. (1996). ***Microfiltration and Ultrafiltration – Principles and Applications.*** Marcel Decker, Inc: New York, USA. pp: 1-48, 524-543.

ANEXOS

ANEXO I: MICRORGANISMOS PRESENTES A DIFERENTES TIEMPOS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE PULQUE.

Microorganismo	Aguamiel	Pulque (a 0h)	Pulque (a 3h)	Pulque (a 6h)	Pulque Comercial
Bacterias					
<i>Acetobacter aceti</i>					X
<i>Acetobacter pomorum</i>					X
<i>Acetobacterium molorum</i>		X	X	X	
<i>Acetobacter orientales</i>				X	
<i>Acinetobacter radioresintens</i>	X	X	X		
<i>Bacillus spp.</i>				X	
<i>Bacillus licheniformis</i>		X			
<i>Bacillus simplex</i>					X
<i>Bacillus subtilis</i>					X
<i>Cellulomonas spp.</i>					X
<i>Chryseobacterium spp.</i>				X	
<i>Citrobacter spp.</i>	X				
<i>Enterobacter spp.</i>	X				
<i>Enterobacter agglomerans</i>		X	X		
<i>Erwinia rhapontici</i>	X				
<i>Escherichia spp.</i>					X
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>					X
<i>Gluconobacter okydans</i>					X
<i>Hafnia alvei</i>					X
<i>Kluyvera ascorbata</i>		X	X		
<i>Kluyvera cochleae</i>	X				
<i>Kokuria rosea</i>					X
<i>Lactobacillus spp.</i>		X	X	X	X
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>					X
<i>Lactobacillus acidophilus</i>			X	X	X
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>					X
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		X			X
<i>Lactobacillus kéfir</i>					X
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>			X		
<i>Lactobacillus plantarum</i>					X
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>		X			
<i>Lactobacillus vermiforme</i>					X
<i>Lactococcus spp.</i>	X				
<i>Lactococcus lactis</i>		X	X		
<i>Leuconostoc spp.</i>					X
<i>Leuconostoc citreum</i>	X	X	X		
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>		X			
<i>Leuconostoc Kimchi</i>	X				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	X	X	X	X	X
<i>Leuconostoc lactis</i>		X	X	X	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>			X		X
<i>Macrocooccus caseolyticus</i>					X
<i>Microbacterium aborescens</i>					X
<i>Micrococcus luteus</i>					X
<i>Pediococcus urinaeequi</i>			X		

Microorganismo	Aguamiel	Pulque (a 0h)	Pulque (a 3h)	Pulque (a 6h)	Pulque Comercial
<i>Providencia</i> spp.				X	
<i>Sarcina</i> spp.					X
<i>Serratia gremensis</i>	X	X			
<i>Streptococcus devriesei</i>	X				
<i>Sterotrophomonas</i> spp.		X			
<i>Zymomonas mobilis</i>			X		X
Levaduras					
<i>Cryptococcus</i> spp.					X
<i>Candida lusitaneae</i>	X				
<i>Candida parapsilosis</i>					X
<i>Candida valida</i>					X
<i>Clavispora lusitaniae</i>					X
<i>Debaryomyces carsonii</i>					X
<i>Hanseniaspora uvarum</i>					X
<i>Kluyveromyces lactis</i>					X
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	X				X
<i>Geotrichum candidum</i>					X
<i>Pichia</i> spp.					X
<i>Pichia guilliermondii</i>					X
<i>Pichia membranifaciens</i>					X
<i>Rhodotorula</i> spp.					X
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					X
<i>Saccharomyces bayanus</i>					X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X	X			X
<i>Saccharomyces pastorianus</i>					X
<i>Torulaspota delbrueckii</i>					X

Fuente: Gutiérrez-Urbe et al., 2017

ANEXO II: FORMATO UTILIZADO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS SENSORIALES

Producto: _____ Fecha: _____

Instrucciones: En el espacio indicado coloca el código de la muestra y de acuerdo a tu preferencia marca con una **X** en el lugar que corresponda a su elección de cada muestra.

Escala	Código de muestra	
Me gusta muchísimo	_____	_____
Me gusta mucho	_____	_____
Me gusta bastante	_____	_____
Me gusta ligeramente	_____	_____
Ni me gusta ni me disgusta	_____	_____
Me disgusta ligeramente	_____	_____
Me disgusta bastante	_____	_____
Me disgusta mucho	_____	_____
Me disgusta muchísimo	_____	_____

Observaciones:

¡GRACIAS!