

3  
4 **Impacto de la aplicación de ozono en la vida de anaquel de aguamiel**

5  
6 Alejandra Cristina Corona-Pérez<sup>1,2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-5644-0588>)

7 Lyzbeth Hernández-Ramos<sup>2,3</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-6621-2116>)

8 María del Rosario García-Mateos<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-2552-3951>)

9 Adalberto Gómez-Cruz<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0009-0001-3066-9026>)

10 Salvador Martínez-Romero<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0009-0002-1223-6312>)

11 Joel Corrales-García<sup>2</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-3347-7476>)

12 Ma. Carmen Ybarra-Moncada<sup>2\*</sup> (<https://orcid.org/0000-0003-4291-2326>)

13  
14 <sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología  
15 Avanzada – Unidad Legaria. Calzada Legaria 694, col. Irrigación, Ciudad de México, C. P. 11500,  
16 México.

17 <sup>2</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de  
18 México, C. P. 56230, México.

19 <sup>3</sup>CONAHCYT-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo,  
20 Estado de México, C. P. 56230, México.

21  
22 \*Autor para correspondencia: [mybarram@chapingo.mx](mailto:mybarram@chapingo.mx), tel. 595 952 1500.

23  
24 **Resumen**

25 **Introducción:** El aguamiel desarrolla un consorcio microbiano que induce la fermentación de sus  
26 azúcares y disminuye sus compuestos bioactivos. El uso de ozono en alimentos ha demostrado ser  
27 una estrategia efectiva para prolongar la vida de anaquel al reducir la carga microbiana.

28 **Objetivo:** Evaluar el efecto de la aplicación de ozono sobre la calidad microbiológica,  
29 fisicoquímica y nutracéutica del aguamiel de *Agave salmiana*.

30 **Metodología:** El aguamiel se extrajo de maguey pulquero cultivado en Coatepec, Estado de  
31 México. Se establecieron tres tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) a una concentración  
32 de  $0.2 \text{ g O}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Las variables evaluadas fueron la población total de microorganismos (PTM),  
33 pH, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, concentración de etanol (%), compuestos  
34 fenólicos totales y actividad antioxidante después de 0, 12, 24 y 48 h de almacenamiento ( $25.44 \pm$   
35  $1.18 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Asimismo, se monitoreó el efecto de la reozonización entre las 48 y 72 h de  
36 almacenamiento.

37 **Resultados:** La aplicación de ozono durante 6 y 12 min mantuvo baja la PTM (entre 6.10 y 6.40  
38  $\log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) durante las primeras 24 h en comparación con el testigo (hasta  $6.63 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Sin embargo, estos tratamientos no conservaron las propiedades fisicoquímicas (pH y SST) ni  
40 nutracéuticas del aguamiel durante el almacenamiento.

41 **Limitaciones del estudio:** Se debe evaluar el posible efecto sinérgico del ozono con otros métodos  
42 de conservación en la estabilidad microbiológica, fisicoquímica y nutracéutica del aguamiel.

43 **Originalidad:** La ozonización podría ser un método alternativo y económico para reducir la  
44 actividad microbiológica del aguamiel.

45 **Conclusiones:** El uso de ozono contribuyó a conservar una baja PTM durante 24 h de  
46 almacenamiento.

47 **Palabras clave:** *Agave salmiana*, estabilidad microbiológica, propiedades fisicoquímicas,  
48 compuestos bioactivos.

49

50 **Recibido:** 11/03/2024

51 **Aceptado:** 16/02/2025

52

### 53 **Ideas sobresalientes**

- 54 • La población total microbiana se redujo 3.30 % en aguamiel tratado con ozono.
- 55 • La reozonización a las 48 h de almacenamiento no impactó en la estabilidad microbiológica  
56 del aguamiel.
- 57 • La reozonización disminuyó 35 % la actividad antioxidante del aguamiel.
- 58 • El ozono no conservó las concentraciones de SST, acidez titulable y etanol del aguamiel  
59 almacenado por 72 h.

60

61

62

## **Introducción**

63

64

65 El aguamiel es la savia extraída de varias especies de agave pulquero, principalmente *A. americana*,  
66 *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* (Enríquez-Salazar et al., 2017), y es fuente  
67 natural de azúcares, proteínas, aminoácidos y minerales. Además, debido a la presencia de  
68 compuestos fenólicos, fructooligosacáridos, saponinas y vitamina C, se puede considerar como una  
69 bebida con potencial nutracéutico (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018).  
70 Tradicionalmente, la producción del aguamiel se destina a la elaboración del pulque: bebida  
71 alcohólica obtenida mediante fermentación. Sin embargo, una alternativa de mayor  
72 aprovechamiento es la elaboración de un concentrado, conocido como jarabe de agave o miel de  
73 maguey, obtenido al someter el aguamiel a un proceso térmico para concentrar los azúcares (de la  
74 Rosa et al., 2023; Martínez-Zavala et al., 2023).

75 Para poder aprovechar el aguamiel como bebida nutracéutica o como materia prima en la  
76 elaboración de jarabe de agave, es necesario conservar sus características fisicoquímicas y  
77 funcionales, como la concentración de azúcares y el contenido de compuestos bioactivos, durante  
78 el almacenamiento. No obstante, el principal reto es disminuir el proceso fermentación espontáneo  
79 que sufre el aguamiel después de ser colectado, ya que su composición química favorece la

80 proliferación de microorganismos. Entre los principales microorganismos reportados en aguamiel  
81 se encuentran levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y  
82 *Clavispora*, y bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*. Estos  
83 microorganismos participan en la fermentación alcohólica, ácida y viscosa del aguamiel (Enríquez-  
84 Salazar et al., 2017), y afectan el sabor y el rendimiento de la producción de jarabe de agave, lo  
85 cual compromete su posible comercialización en fresco. Por ello, la aplicación de métodos de  
86 conservación durante el transporte y almacenamiento del aguamiel es fundamental para preservar  
87 sus propiedades.

88 Con la finalidad de reducir o inhibir el proceso de fermentación espontánea, así como minimizar  
89 las pérdidas nutricionales y funcionales, es común el uso de tratamientos térmicos, los cuales  
90 permiten garantizar la inocuidad de los productos. No obstante, estos tratamientos pueden provocar  
91 cambios indeseables en color, sabor y funcionalidad, lo que ha impulsado la exploración de  
92 tecnologías emergentes no térmicas como la ozonización (García-Mateos et al., 2019).

93 El ozono es un agente oxidante altamente efectivo, cuya capacidad antimicrobiana se debe a la  
94 inactivación de microorganismos mediante la destrucción de varios componentes celulares, como  
95 la pared y la membrana celular (Pandiselvam et al., 2022). Asimismo, se ha reportado que su  
96 aplicación en alimentos y bebidas mantiene la calidad organoléptica, nutricional y funcional.  
97 Zardzewiały et al. (2023) mencionan que las cervezas de trigo enriquecidas con peciolas de  
98 ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) tratados con ozono (50 ppm por 30 min) fueron más estable, desde  
99 el punto de vista microbiológico, que las cervezas sin tratamiento. Gorzelany et al. (2024)  
100 observaron que la ozonización mejoró la estabilidad microbiológica del membrillo japonés y de las  
101 cervezas adicionadas con este fruto tratado. Chauhan y Negi (2024) afirman que el ozono inhibe el  
102 crecimiento microbiano en zumo de manzana, y Wang et al. (2024) demostraron el potencial del  
103 ozono para reducir la concentración de dos micotoxinas de *Alternaria* (alternariol y alternariol  
104 monometil) en jugo de naranja sin afectar su calidad.

105 Es importante considerar que la eficacia del ozono en la reducción de microorganismos depende  
106 de diversos parámetros, como el tiempo, la dosis, la temperatura, la presión y la humedad relativa.  
107 Además, factores intrínsecos del alimento como el pH, la conductividad y la composición química  
108 pueden influir en la efectividad del tratamiento (Epelle et al., 2023). Lo anterior resalta la necesidad  
109 de continuar estudiando la aplicación de ozono en productos altamente perecederos, tal es el caso

110 del aguamiel. Hasta el momento, no se cuenta con información sobre el impacto del ozono en  
111 aguamiel durante diferentes etapas de almacenamiento previas a su procesamiento. Por ello, el  
112 objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono y reozonización  
113 sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica (pH, sólidos solubles totales [SST] y acidez  
114 titulable [AT]), producción de etanol (% v/v) y calidad nutracéutica (compuestos fenólicos  
115 solubles totales [CFST] y actividad antioxidante [AA]) en aguamiel de *A. salmiana*.

116

117

118

## Materiales y métodos

119

120

121 El aguamiel utilizado en la investigación se obtuvo de plantas de maguey pulquero (*A. salmiana*  
122 Otto ex Salm-Dyck cultivar Ayoteco) en Coatepec, Estado de México, durante mayo de 2021. El  
123 aguamiel se recolectó durante 5 días en la mañana a partir de plantas en producción intermedia. La  
124 unidad experimental constó de 100 mL de aguamiel extraídos de una muestra compuesta de 1 L y  
125 el día de recolección se estableció como factor de bloqueo.

126 El aguamiel se colocó en botellas de vidrio, previamente esterilizadas, para su conservación y  
127 traslado a aproximadamente 2 °C mediante el uso de hielo seco. El tiempo estimado de traslado  
128 hasta su análisis fue de 1 h.

129

130

131

### Aplicación de ozono

132

133

134 La ozonización del aguamiel se realizó con un generador de ozono semi-industrial (PTA mini,  
135 Biozon, México) con tasa de inyección fija de 1.2 g·h<sup>-1</sup>. Con base en estudios previos (García-

136 Mateos et al., 2019), se evaluaron tiempos preliminares de exposición al ozono en aguamiel. Los  
137 resultados obtenidos y el interés de preservar la calidad nutracéutica del aguamiel fundamentaron  
138 la selección de tiempos cortos (6 y 12 min de ozono) más el testigo (0 min), ya que el ozono, por  
139 su capacidad oxidante, puede degradar compuestos fitoquímicos (Tiwari et al., 2013).

140 Las unidades experimentales del aguamiel se colocaron en probetas de vidrio de 300 mL para evitar  
141 derrames. La inyección de ozono se realizó con una manguera de polipropileno perforada, la cual  
142 se introdujo a la probeta de vidrio para incrementar el contacto del ozono con la muestra.

143

144

### 145 **Recuento de la población de microorganismos en el aguamiel**

146

147

148 El recuento la población total de microorganismos (PTM) se realizó en una cámara Neubauer. Para  
149 ello, se diluyó 1 mL de cristal violeta en 9 mL de agua esterilizada. Posteriormente, se mezclaron  
150 0.5 mL de muestra con 0.5 mL de cristal violeta previamente diluido. El conteo se efectuó con un  
151 microscopio óptico a 100× en cinco cuadrantes y se calculó el promedio. La PTM se estimó  
152 mediante la siguiente ecuación:

153

$$154 \quad PTM = (\underline{Y})(FD)(2)(10\ 000)$$

155

156 donde:  $\underline{Y}$  es el promedio de cinco cuadrantes,  $FD$  es el factor de dilución de la muestra, 2 es el  
157 factor de dilución de la tinción y 10 000 corresponde al factor de conversión de 0.1  $\mu$ L a 1 mL  
158 (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

159 Adicionalmente, se llevó a cabo el conteo de levaduras totales (LT) de acuerdo con la metodología  
160 establecida por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012) mediante el uso de  
161 Placas YM 3M™ Petrifilm™. Además, se realizó la cuantificación de bacterias ácido-lácticas en  
162 agar MRS (Sigma-Aldrich, EUA).

163

164

165

## **Variables fisicoquímicas**

166

167

168 Las variables fisicoquímicas evaluadas fueron: SST, AT, pH y concentración de etanol. Los SST  
169 se determinaron en un refractómetro digital portátil (PAL-1®, ATAGO®, EUA) y los datos se  
170 expresaron en °Brix. La AT se cuantificó por volumetría y se expresó como g de ácido láctico por  
171 L de aguamiel. El pH se midió con un potenciómetro (HI-2221, Hanna Piccolo®, EUA). Las  
172 últimas dos variables se analizaron de acuerdo con los métodos descrito por la AOAC (2005).

173 La concentración de etanol se cuantificó mediante la técnica de espacio de cabeza descrita por  
174 Davis y Chace (1969). Para ello, se colocaron 5 mL de aguamiel en un vial de vidrio de 26 mL, el  
175 cual se selló herméticamente. Después, con una jeringa de 1 mL, se extrajo el aire del espacio de  
176 cabeza y se inyectó en un cromatógrafo de gases (7890a, Agilent Technologies®, EUA) equipado  
177 con una columna capilar (Varian Star 3400, EUA), un detector de conductividad térmica (TCD) y  
178 un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó helio como gas portador. Previo al análisis, se  
179 inyectó un estándar de etanol de concentración conocida para obtener la curva de calibración. Los  
180 resultados se expresaron como porcentaje de etanol (v/v).

181

182

## **Variables nutraceuticas**

184

185

### **Preparación del extracto**

186

187 El aguamiel se disolvió en metanol acuoso a 80 % (v/v) para obtener una concentración del extracto  
188 al 30 % (v/v). La mezcla se homogeneizó en un vortex (Maxi-Mix II, M63215, Thermolyne, EUA)

189 y se incubó a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, el extracto se centrifugó (YV-17414-21, Cole-  
190 Parmer®, EUA) a 2 598 ×g por 5 min para separar el sobrenadante y eliminar los sólidos no  
191 solubles que pudieran interferir en la cuantificación fitoquímica. Este extracto metanólico se utilizó  
192 para determinar el contenido de CFST y la AA en el aguamiel.

193

### 194 **Cuantificación de compuestos fenólicos solubles totales**

195

196 Esta determinación se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Para  
197 ello, se mezclaron 0.2 mL del extracto metanólico con 2 mL de agua y 0.2 mL del reactivo de  
198 Folin-Ciocalteu (2 N, Sigma-Aldrich), y se dejó reposar durante 3 min. Después, se adicionaron  
199 0.8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5 %, p/v) y se dejó reposar en oscuridad a temperatura ambiente durante 1  
200 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s, Thermo  
201 Fisher Scientific, EUA). La cuantificación se realizó a partir de la curva estándar de ácido gálico:  
202  $y = 5.9982x - 0.0025$ ;  $R^2 = 0.992$ . Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico  
203 por 100 mL de aguamiel (mg<sub>EAG</sub> 100 mL<sup>-1</sup>).

204

### 205 **Determinación de la actividad antioxidante**

206

207 **Ensayo ABTS<sup>•+</sup>**. La capacidad antioxidante mediante la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> se determinó  
208 de acuerdo con el método descrito por Miller y Rice-Evans (1996), con algunas modificaciones.  
209 Primero, se preparó una solución 7 mM de ABTS<sup>•+</sup> en agua destilada y otra de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a 2.45 mM,  
210 y se mezclaron en una relación 1:1. La solución resultante se dejó reposar en oscuridad por 16 h y  
211 después se diluyó con etanol anhidro hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  a 734 nm. Se  
212 utilizó metanol acuoso al 80 % (v/v) como blanco. Por otra parte, se mezclaron 2000 µL de la  
213 solución ABTS<sup>•+</sup> con 20 µL del extracto de la muestra y se dejó reaccionar en oscuridad a  
214 temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la mezcla a 734  
215 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, EUA). La AA se cuantificó  
216 a partir de una curva estándar de trolox:  $y = 41.721x + 3.9051$ ;  $R^2 = 0.991$ , y los resultados se

217 expresaron en micromoles equivalentes de trolox por 100 mL de aguamiel en peso fresco  
218 ( $\mu\text{M}_{\text{ET}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

219 **Ensayo FRAP.** La actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP se llevó a cabo según la  
220 metodología propuesta por Benzie y Strain (1996). Para preparar el reactivo de FRAP, se mezcló  
221 una solución de buffer de acetato (300 mM a pH 3.6), una solución de férrico-2,4,6-tripiridil-s-  
222 triazina (TPTZ, 10 mM en HCl 40 mM) y  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) en relación 10:1:1. Posteriormente, se  
223 mezclaron 3 mL del reactivo de FRAP, 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 100  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico.  
224 La mezcla se incubó en un baño de agua a 37 °C por 30 min y se midió la absorbancia a 593 nm  
225 en un espectrofotómetro (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, EUA). La cuantificación de la  
226 AA se realizó mediante una curva estándar de trolox:  $y = 0.0012x - 0.0269$ ;  $R^2 = 0.9965$ . Los  
227 resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por cada 100 mL de aguamiel en  
228 peso fresco ( $\mu\text{M}_{\text{ET}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

229

230

231

### **Análisis estadístico**

232

233

234 El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar con estructura factorial  
235  $3 \times 4$ . Además, por la naturaleza de la investigación, el diseño experimental se analizó mediante  
236 un modelo mixto (Zhao, 2019), el cual conduce a resultados más robustos y a un mayor grado de  
237 generalización en las conclusiones. Los niveles evaluados fueron tres para el tiempo de aplicación  
238 de ozono (0, 6, 12 min) y cuatro para el tiempo de almacenamiento (0, 12, 24 y 48 h). El factor de  
239 bloqueo fue el periodo de colecta del material experimental debido a la variabilidad del aguamiel  
240 entre días de cosecha. Esta estructura generó doce tratamientos con cinco repeticiones cada uno.

241 En el modelo mixto, el factor bloques se trató como un efecto aleatorio, mientras que el tiempo de  
242 ozono, tiempo de almacenamiento y su interacción se consideraron efectos fijos. Todos los  
243 resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar, y se aplicó la prueba de comparación de

244 medias de Tukey–Kramer ( $\alpha = 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó en el programa SAS ver. 9.0  
245 (SAS Institute Inc., 2002).

246

247

248

## Resultados y discusión

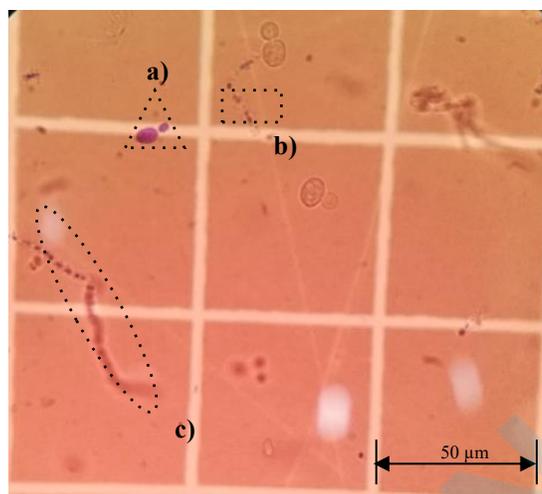
249

250

251 Uno de los principales retos de la industria de producción de jarabe de agave es disminuir o evitar  
252 la fermentación del aguamiel durante su traslado a la unidad de proceso. El aguamiel alberga un  
253 consorcio de microorganismos que lo hace susceptible a procesos de fermentación en periodos  
254 cortos. Por ello, es importante emplear métodos de cuantificación adecuados que permita  
255 determinar la concentración de microorganismos en un volumen y tiempo específicos.

256 Desde el punto de vista técnico, el uso de la cámara Neubauer es una opción viable para el conteo  
257 microbiano, ya que es un método rápido y directo que permite conocer la morfología de los  
258 microorganismos presentes. Así, al complementar estos resultados con descripciones morfológicas  
259 y estructurales disponibles en la literatura, es posible inferir el tipo de microorganismos presentes  
260 en el aguamiel. No obstante, la siembra en medios de cultivo selectivos es necesaria para confirmar  
261 la identidad microbiana. En la presente investigación se aplicó el enfoque anterior para la  
262 identificación de microorganismos (Figura 1).

263



264

265 **Figura 1.** Visualización de microorganismos en la cámara Neubauer con microscopio óptico

266 100×: a) levaduras, b) bacterias ácido-lácticas y c) *Leuconostoc*.

267

268

### 269 **Población total de microorganismos**

270

271

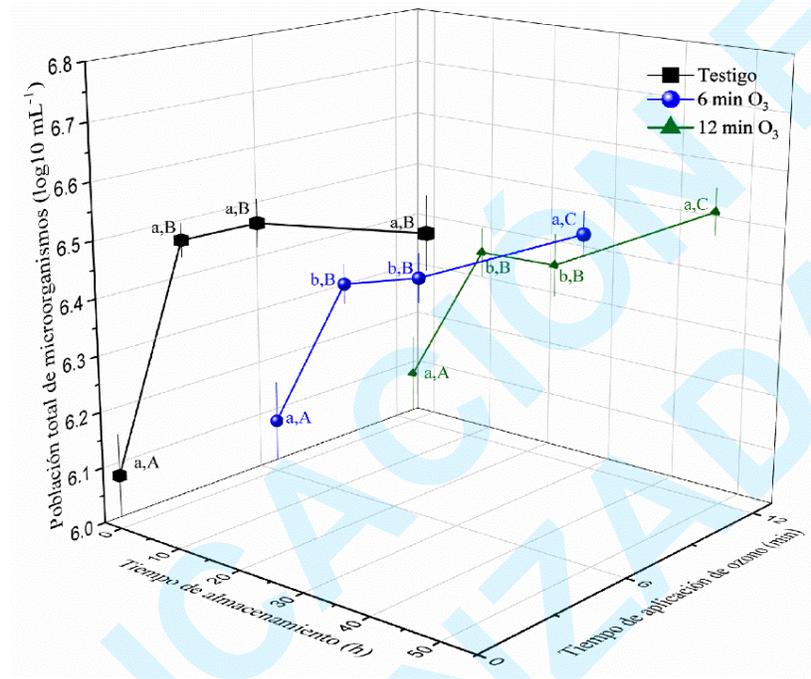
272 De acuerdo con las características morfológicas observadas, se identificaron microorganismos de  
 273 los grupos bacilos y levaduras (Figura 1). La presencia de bacilos se asocia principalmente con  
 274 bacterias ácido-lácticas (BAL), donde destaca el género *Leuconostoc*, caracterizado por bacilos  
 275 cortos dispuestos en cadena (Rao et al., 2023).

276 Torres-Rodríguez et al. (2014) reportaron una gran abundancia de BAL en bebidas fermentadas  
 277 tradicionales, e identificaron a *Leuconostoc mesenteroides* en la savia de agave, considerada como  
 278 una de las BAL más importante en el proceso de fermentación del aguamiel. Por otro lado,  
 279 Enríquez-Salazar et al. (2017) identificaron diferentes géneros de BAL y levaduras con posibles  
 280 aplicaciones industriales, como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Clavispora*.

281 En el presente estudio, se observó que durante las primeras 24 h de almacenamiento la PTM en el  
 282 testigo fue estadísticamente superior ( $p < 0.05$ ) a los tratamientos con ozono (Figura 2). Entre las

283 12 y 24 h, no se observó un aumento significativo de microorganismos en aguamiel, al registrarse  
 284 un promedio de 6.56 y 6.39  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> en el testigo y con la aplicación de ozono (6 y 12 min),  
 285 respectivamente. A partir de las 48 h de almacenamiento, el efecto del ozono dejó de ser  
 286 significativo, con una PTM promedio de 6.57  $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup> en los tres tratamientos.

287



288

289 **Figura 2.** Población total de microorganismos ( $\log_{10}$  UFC·mL<sup>-1</sup>) en aguamiel de *A. salmiana*  
 290 tratado con diferentes tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) en distintos periodos de  
 291 almacenamiento a temperatura ambiente (0, 12, 24 y 48 h). Letras minúsculas corresponden al  
 292 tiempo de aplicación de ozono (min) dentro de cada tiempo de almacenamiento, y letras  
 293 mayúsculas corresponden al tiempo de almacenamiento (h) dentro de cada tiempo de aplicación  
 294 de ozono. Letras distintas indican diferencias estadísticas (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

295

296

297

### Células viables

298

299

300 Una vez cuantificada la PTM, se determinó la presencia de células viables de BAL y LT mediante  
 301 el recuento de UFC en medios de cultivos selectivos. Estas pruebas se realizaron únicamente en las  
 302 muestras almacenadas durante 24 y 48 h, para 0 y 12 min de exposición al ozono (Cuadro 1). El  
 303 análisis estadístico reveló una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre dichas variables. El  
 304 tratamiento con 12 min de aplicación de ozono a 24 h resultó significativamente inferior al  
 305 tratamiento sin ozono con 48 h de almacenamiento, tanto en el conteo de BAL como en el de LT.

306

307 **Cuadro 1.** Población total de microorganismos: bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras  
 308 totales (LT) en aguamiel tratado con diferentes tiempos de exposición a ozono.

| Microorganismo                           | Tiempo de almacenamiento (h) | Tiempo de exposición a ozono (min) |                |
|--|------------------------------|------------------------------------|----------------|
|  |                              | 0                                  | 12             |
| BAL ( $\log_{10}$ UFC·mL <sup>-1</sup> ) | 24                           | 5.26 ± 0.04 ab                     | 5.01 ± 0.18 bc |
|  | 48                           | 5.98 ± 0.16 a                      | 5.86 ± 0.24 ab |
| LT ( $\log_{10}$ UFC·mL <sup>-1</sup> )  | 24                           | 5.85 ± 0.12 ab                     | 5.70 ± 0.05 bc |
|  | 48                           | 6.68 ± 0.04 a                      | 6.28 ± 0.33 ab |

309 Medias con letras distintas indican diferencias estadísticas (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ) entre  
 310 tratamientos dados por la interacción tiempo de almacenamiento × tiempo de exposición a ozono.

311

312 La temperatura fue un factor que probablemente influyó en el crecimiento de los microorganismos  
 313 durante las primeras 48 h, ya que las muestras se encontraban a  $25.44 \pm 1.18$  °C. Se ha reportado  
 314 que el crecimiento microbiano está influenciado por la temperatura de almacenamiento. En  
 315 particular, las BAL presentan un crecimiento óptimo entre 28 a 37 °C, mientras que las levaduras  
 316 se pueden desarrollar entre 10 y 50 °C, con un óptimo crecimiento entre 20 a 35 °C (Lin et al.,  
 317 2012; Velázquez-López et al., 2018). Por lo anterior, se recomienda evaluar el efecto sinérgico del  
 318 ozono y el uso de refrigeración en futuras investigaciones.

319

320

321

## Caracterización fisicoquímica

322

323

324 Los parámetros de AT, pH y SST están altamente relacionados con los resultados obtenidos en el  
325 Cuadro 1, ya que las BAL y las LT son las principales responsables de la fermentación, proceso  
326 que provoca cambios en la calidad del aguamiel.

327

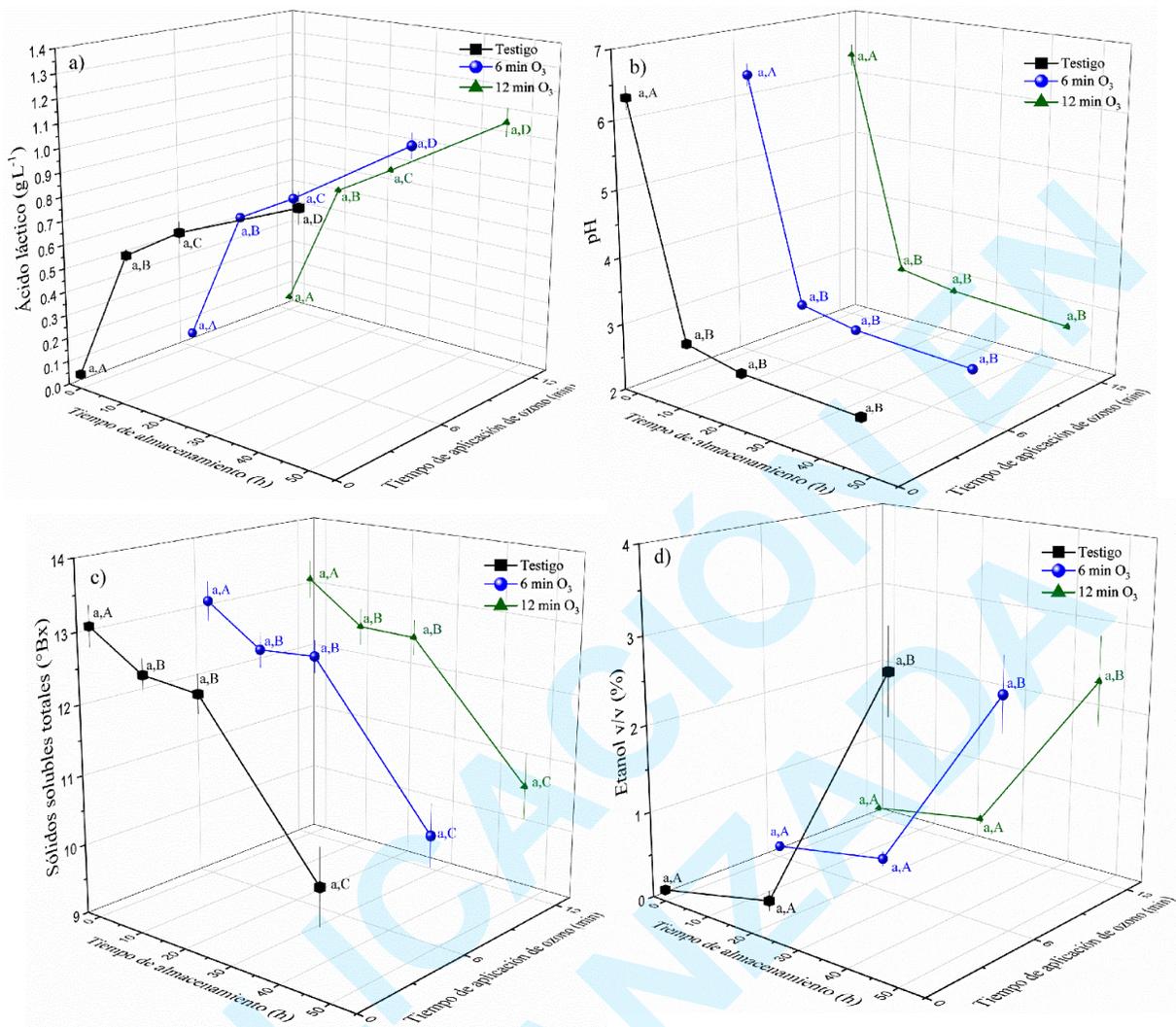
328

### Acidez titulable

329

330 La presencia de BAL en el aguamiel permite considerar la cuantificación de ácido láctico (uno de  
331 los principales metabolitos de las BAL) como un indicador del inicio del proceso de fermentación.  
332 El efecto del ozono sobre la producción de ácido láctico en aguamiel fue consistente dentro de los  
333 tiempos de almacenamiento (Figura 3a), sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes  
334 niveles de su aplicación (letras minúsculas). Esto puede estar relacionado con el incremento  
335 significativo de células viables responsables de la producción de ácido láctico. Por otra parte, el  
336 tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la producción de ácido láctico,  
337 al registrarse un aumento promedio de 0.06 a 1.04 g·L<sup>-1</sup> después de 48 h. Este aumento se puede  
338 atribuir a la actividad de las BAL, conocidas por producir principalmente ácido láctico como  
339 producto final de la fermentación de azúcares (Ojo & de Smidt, 2023). En aguamiel se ha observado  
340 que durante la fermentación ácida se generan algunos metabolitos importantes, como el ácido  
341 láctico, que es producido por *Lactobacillus* sp. y *Leuconostoc* sp. (Escalante et al., 2016).

342



343  
 344 **Figura 3.** Características fisicoquímicas de aguamiel de *A. salmiana* tratada con diferentes  
 345 tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) en diferentes tiempos de almacenamiento a  
 346 temperatura ambiente (0, 12, 24 y 48 h): a) acidez titulable, b) pH, c) sólidos solubles totales y d)  
 347 concentración de etanol. Letras minúsculas corresponden al tiempo de aplicación de ozono (min)  
 348 dentro de cada tiempo de almacenamiento, y letras mayúsculas corresponden al tiempo de  
 349 almacenamiento (h) dentro de cada tiempo de aplicación de ozono. Letras distintas indican  
 350 diferencias estadísticas (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

351

352

pH

353

354 El tiempo de aplicación de ozono no tuvo un efecto significativo sobre el pH del aguamiel; sin  
355 embargo, el tiempo de almacenamiento sí influyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ). Se observó  
356 una disminución drástica del pH durante las primeras 12 h de almacenamiento, al pasar de 6.36 a  
357 2.99 en promedio (Figura 3b). La acidificación en sistemas de fermentación puede estar relacionada  
358 con la producción de ácidos orgánicos (Contreras-López et al., 2023), lo cual coincide con el  
359 aumento observado de ácido láctico en el aguamiel (Figura 3a).

360

### 361 **Sólidos solubles totales**

362

363 Los SST proporcionan información sobre el contenido de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos  
364 inorgánicos. En la Figura 3c se observa que los tiempos de aplicación de ozono no tuvieron un  
365 efecto significativo sobre los SST ( $p < 0.05$ , letras minúsculas). Sin embargo, la concentración de  
366 SST disminuyó significativamente a las 48 h de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento  
367 se puede atribuir a la transformación de los azúcares en etanol y exopolisacáridos por la actividad  
368 de levaduras y bacterias durante la fermentación (García-Arce & Castro-Muñoz, 2021).

369

### 370 **Concentración de etanol**

371

372 Debido a los cambios no significativos de las variables pH y SST entre las 12 y 24 h, la  
373 cuantificación de etanol se realizó únicamente a las 0, 24 y 48 h de almacenamiento. En este  
374 sentido, se observó una baja concentración de etanol durante las primeras 24 h de almacenamiento,  
375 con una producción de 0.13 a 0.40 % de etanol (v/v) (Figura 3d); sin embargo, la producción de  
376 etanol presentó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) a las 48 h. Al igual que en otras variables,  
377 el tiempo de aplicación de ozono no tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la producción de  
378 etanol, ya que todos los tratamientos tuvieron un aumento similar a las 48 h de almacenamiento.  
379 Aunque el testigo alcanzó la mayor concentración de etanol (3.18 %, v/v), esta no fue  
380 estadísticamente diferente a la de los tratamientos con ozono, lo cual sugiere que la aplicación de  
381 ozono no logró frenar el proceso de fermentación en las condiciones evaluadas.

382 A pesar del incremento en la concentración de etanol, los valores obtenidos son inferiores a los  
383 reportados por Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez (2007) en las diferentes etapas de  
384 fermentación del aguamiel para la obtención de pulque, con valores de 7.01 a 7.03 % (v/v) de etanol  
385 en la semilla (pulque con 60 días de fermentación), 6.25 a 6.34 % en la contrapunta (pulque con  
386 24 h de fermentación, mezcla 1:1 de aguamiel y semilla), y hasta 10.35 % de etanol en la corrida  
387 (pulque con 48 h de fermentación, etapa final). La producción de etanol está estrechamente  
388 relacionada con la actividad de levaduras del género *Saccharomyces*, reconocidas por su papel  
389 predominante en la fermentación alcohólica de bebidas tradicionales como el pulque (Rocha-  
390 Arriaga & Cruz-Ramírez, 2022). La persistencia de estas levaduras podría explicar el aumento de  
391 etanol observado, incluso en las muestras tratadas con ozono.

392

393

394

## Calidad nutracéutica

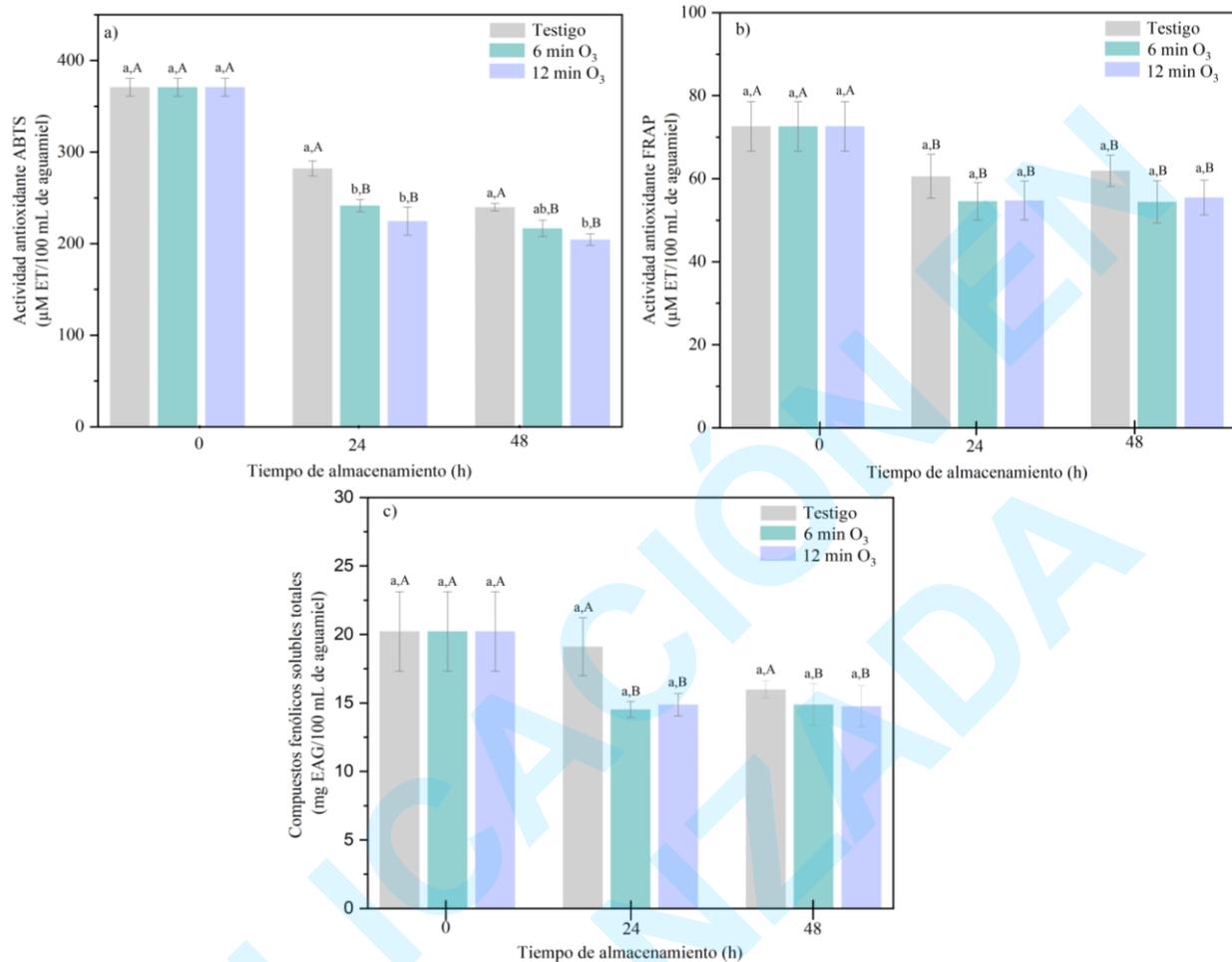
395

396

### Actividad antioxidante (AA)

397

398 La AA determinada mediante ABTS<sup>•+</sup> se vio afectada por los diferentes tiempos de aplicación de  
399 ozono (Figura 4a). A las 24 h de almacenamiento, la aplicación de 12 min de ozono disminuyó en  
400 un 22.9 % la AA con respecto al testigo (0 min de ozono) (Figura 4a). Estos resultados son similares  
401 a los reportados por Panigrahi et al. (2020), quienes observaron una reducción del 30 % en la AA  
402 al tratar jugo de caña con ozono a una concentración de 26.4 %. En contraste, el análisis con el  
403 método de FRAP (Figura 4b) no mostró diferencias significativo ( $p < 0.05$ ) del ozono sobre la AA  
404 del aguamiel durante las 48 h de almacenamiento, con valores promedio de 54.42 a 72.64  $\mu\text{MET} \cdot 100$   
405  $\text{mL}^{-1}$ . La diferencia entre ambos métodos se podría atribuir a la sensibilidad del ensayo ABTS<sup>•+</sup>, el  
406 cual es reconocido por su capacidad para detectar un amplio rango de compuestos antioxidantes en  
407 matrices tanto hidrofílicas como lipofílicas (Munteanu & Apetrei, 2021). Esta característica  
408 explicaría la detección del efecto del ozono en el ensayo ABTS<sup>•+</sup> en comparación con el ensayo  
409 FRAP.



411 **Figura 4.** Actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS<sup>+</sup> (a) y FRAP (b), y  
 412 concentración de compuestos fenólicos solubles totales (c) en aguamiel de *A. salmiana* tratada  
 413 con diferentes tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) en diferentes tiempos de  
 414 almacenamiento a temperatura ambiente (0, 24 y 48 h). Letras minúsculas corresponden al  
 415 tiempo de aplicación de ozono (min) dentro de cada tiempo de almacenamiento, y letras  
 416 mayúsculas corresponden al tiempo de almacenamiento (h) dentro de cada tiempo de aplicación  
 417 de ozono. Letras distintas indican diferencias estadísticas (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

418

419 Por otra parte, la AA descendió gradualmente en todas las unidades experimentales a las 48 h de  
 420 almacenamiento, sin mostrar diferencias estadísticas entre los tiempos de aplicación de ozono  
 421 (Figuras 4a-b).

422

423

### Compuestos fenólicos solubles totales

424

425 La aplicación de ozono no tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el contenido de CFST en  
426 el aguamiel (Figura 4c), lo cual sugiere que es posible aplicar ozono al aguamiel sin afectar sus  
427 propiedades nutraceuticas. Este hallazgo coincide con estudios previos que indican que el impacto  
428 del ozono en líquidos suele ser mínimo en comparación con otras tecnologías. Panigrahi et al.  
429 (2020) observaron una ligera disminución (13.5 %) del contenido de CFST en jugo de caña tratada  
430 con ozono, mientras que Ari et al. (2020) reportaron que la aplicación de ozono permitió conservar  
431 las características de calidad del jugo de manzana, entre ellas el contenido de CFST.

432 Por otro lado, el tiempo de almacenamiento afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de  
433 CFST en los tratamientos con ozono (Figura 4c). Esto se podría atribuir a la autooxidación que  
434 sufren los CFST en presencia de oxígeno, polifenol oxidasas y peroxidasas (Zhang et al., 2022).  
435 Además, a partir de las 24 h se detectaron cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas  
436 del aguamiel (Figura 3), lo que podría indicar el inicio del proceso de fermentación, el cual pudo  
437 tener un efecto sobre la reducción de los CFST. Melini y Melini (2021) mencionan que la  
438 disminución de los CFST se puede deber a su degradación o hidrólisis, provocada por enzimas y  
439 microorganismos.

440

441

### Reozonización

442

443 A las 48 h de almacenamiento, se reinyectó ozono a las unidades experimentales de los seis  
444 tratamientos. El Cuadro 2 presenta los resultados de las ocho variables evaluadas, y se observa que  
445 no hubo interacción significativa entre los factores. Las comparaciones realizadas contrastan los  
446 niveles de un factor dentro de cada nivel del segundo factor.

447 La reozonización no mostró un efecto significativo ( $p < 0.05$ , letras minúsculas) sobre la PTM, AT,  
448 pH, SST, concentración de etanol ni CFST durante el periodo de 48 a 72 h (Cuadro 2). Esto se  
449 puede atribuir a la influencia de diversos factores sobre la eficiencia del ozono, como el pH del

450 medio, temperatura, humedad, concentración y tiempo de contacto, composición de la muestra,  
 451 tipo de microorganismos y su estado fisiológico, entre otros (Kim et al., 2003; Xue et al., 2023).  
 452 En este sentido, dado que las muestras de aguamiel presentaban un pH ácido (2.64 - 2.78), la  
 453 efectividad del ozono se vio afectada negativamente. En particular, el pH ácido del aguamiel (2.64-  
 454 2.78) redujo la efectividad del ozono, ya que su capacidad oxidativa es mayor en medios básicos  
 455 debido a la formación de radicales hidroxilo, cuyo potencial de oxidación es mayor de 2.80 V  
 456 (Panigrahi et al., 2020).

457

458 **Cuadro 2.** Características fisicoquímicas del aguamiel reozonizado con diferentes tiempos de  
 459 exposición a ozono en dos tiempos de almacenamiento.

| Variables  | Tiempo (h) | Tiempo de exposición a ozono (min) |                   |                   |
|--|------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|
|  |            | 0                                  | 6                 | 12                |
| PTM (log <sub>10</sub><br>UFC·mL <sup>-1</sup> )         | 48         | 6.63 ± 0.05 aA                     | 6.56 ± 0.03 aA    | 6.52 ± 0.04 aA    |
|  | 72         | 6.68 ± 0.04 aB                     | 6.62 ± 0.03 aB    | 6.59 ± 0.02 aB    |
| AT (g·L <sup>-1</sup> )                                  | 48         | 0.98 ± 0.05 aA                     | 1.09 ± 0.05 aA    | 1.07 ± 0.05 aA    |
|  | 72         | 1.22 ± 0.06 aB                     | 1.20 ± 0.06 aA    | 1.23 ± 0.09 aB    |
| pH   | 48         | 2.78 ± 0.04 aA                     | 2.74 ± 0.05 aA    | 2.73 ± 0.04 aA    |
|  | 72         | 2.64 ± 0.03 aB                     | 2.68 ± 0.04 aA    | 2.69 ± 0.03 aA    |
| SST (°Brix)  | 48         | 10.48 ± 0.52 aA                    | 10.52 ± 0.43 aA   | 10.64 ± 0.46 aA   |
|  | 72         | 8.06 ± 0.22 aB                     | 8.12 ± 0.28 aB    | 8.60 ± 0.58 aB    |
| Etanol (% v/v)   | 48         | 3.18 ± 0.44 aA                     | 2.59 ± 0.42 aA    | 2.37 ± 0.52 aA    |
|  | 72         | 5.95 ± 0.60 aB                     | 5.71 ± 0.69 aB    | 4.75 ± 0.70 aB    |
| CFST<br>(mg <sub>EAG</sub> 100 mL <sup>-1</sup> )        | 48         | 15.99 ± 0.64 aA                    | 14.89 ± 1.52 aA   | 14.77 ± 1.50 aA   |
|  | 72         | 15.22 ± 0.48 aA                    | 12.98 ± 1.31 aB   | 12.17 ± 1.50 aB   |
| AA por ABTS <sup>+</sup><br>(μMET·100 mL <sup>-1</sup> ) | 48         | 239.81 ± 3.91 aA                   | 216.71 ± 8.94 bA  | 204.37 ± 6.31 bA  |
|  | 72         | 242.26 ± 14.69 aA                  | 185.88 ± 11.18 bB | 158.99 ± 15.33 bB |
| AA por FRAP<br>(μMET·100 mL <sup>-1</sup> )              | 48         | 61.94 ± 3.78 aA                    | 54.42 ± 5.10 aA   | 55.49 ± 4.18 aA   |
|  | 72         | 58.17 ± 6.13 aA                    | 42.31 ± 2.72 bB   | 38.03 ± 4.75 bB   |

460 PTM: población total de microorganismos; AT: acidez titulable; SST: sólidos solubles totales;  
 461 AA: actividad antioxidante; CFST: compuestos fenólicos solubles totales; ABTS<sup>+</sup>: método de

462           cuantificación de actividad antioxidante por radical libre ABTS<sup>+</sup>; FRAP: método de  
463           cuantificación de actividad antioxidante por poder antioxidante reductor del hierro. Compuestos  
464           fenólicos solubles totales (mg EAG 100 mL<sup>-1</sup>). Actividad antioxidante (μM TE 100 mL<sup>-1</sup>).  
465           Medias seguidas por letras minúsculas corresponden al tiempo de aplicación de ozono para cada  
466           tiempo de almacenamiento dentro de cada variable, y letras mayúsculas corresponden al tiempo  
467           de almacenamiento para cada tiempo de aplicación de ozono dentro de cada variable. Letras  
468           distintas indican diferencias estadísticas (Tukey - Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

469  
470           El tiempo de almacenamiento (48 h vs. 72 h) tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ , letras  
471           mayúsculas), al reducir los valores de las variables nutracéuticas y fisicoquímicas, excepto en la  
472           AT y la PTM, las cuales presentaron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de las 48 a 72 h en el  
473           tratamiento con 12 min de exposición al ozono.

474           El pH es un factor crítico en la reactividad del ozono. En medios ácidos, su eficiencia se ve limitada  
475           debido a la menor generación de radicales hidroxilo, mientras que en condiciones alcalinas la  
476           formación de especies reactivas (como hidroxilos, hidroperóxidos y superóxidos) potencia su  
477           acción oxidante, lo cual facilita la desintegración de las paredes celulares microbianas debido a  
478           estrés oxidativo y provoca la lisis celular (Martins-Pinheiro et al., 2019; Xue et al., 2023). De  
479           acuerdo con Xue et al. (2023), la efectividad del ozono también está estrechamente relacionada con  
480           la temperatura, ya que su estabilidad mejora en medios ácidos si se combinan con bajas  
481           temperaturas (pH 3.0 y 8.0 °C). Por ello, se sugiere que futuras investigaciones evalúen el efecto  
482           sinérgico del ozono y la refrigeración sobre la estabilidad microbiológica y bioquímica del  
483           aguamiel.

484           Con base en los resultados presentados en las Figuras 2 y 3, se sugiere que la reozonización del  
485           aguamiel a las 24 h de almacenamiento podría reducir significativamente la carga microbiana. Esto  
486           debido a que, a las 24 h, la PTM fue menor y algunas propiedades fisicoquímicas se mantuvieron  
487           más estables (SST y concentración de etanol) en comparación con las muestras almacenadas por  
488           48 h.

489           Por último, es importante destacar que la reozonización afectó significativamente la AA del  
490           aguamiel cuantificada por los dos métodos (Cuadro 2). Las muestras tratadas con 6 y 12 min de

491 ozono presentaron una disminución de 35 % en la AA a las 72 h de almacenamiento en  
492 comparación con el testigo.

493

494

## 495 **Conclusiones**

496

497

498 El aguamiel tratado con 6 y 12 min de ozono mantuvo una baja población total de microorganismos  
499 durante las primeras 24 h de almacenamiento en comparación con el testigo. Sin embargo, el ozono  
500 no permitió conservar la calidad fisicoquímica y nutracéutica original del aguamiel. La  
501 reozonización aplicada a las 48 h de almacenamiento solo impactó en la actividad antioxidante, al  
502 reducir hasta en un 35 % con respecto al testigo, sin contribuir en la estabilización microbiana.  
503 Debido a la falta de información sobre el uso de tecnologías no térmicas para la conservación del  
504 aguamiel, los resultados de este estudio ofrecen una base para futuras investigaciones centradas en  
505 la preservación de bebidas tradicionales. Se recomienda explorar el posible efecto sinérgico entre  
506 el ozono y la refrigeración para mejorar la vida de anaquel del aguamiel, ya que en el presente  
507 estudio los tratamientos se almacenaron a temperatura ambiente.

508

509

## 509 **Agradecimientos**

510 La primera autora agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías  
511 (CONAHCY), por la beca otorgada para realizar sus estudios de Maestría (número de registro:  
512 746875).

513

514

## 514 **Referencias**

515 Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official methods of analysis* (18th  
516 ed.). Association of Official Agricultural Chemists.

- 517 Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Official methods of analysis* (19th  
518 ed.). Association of Official Agricultural Chemists.
- 519 Ari, B., Budak, N. H., Seydim, A. C., & Güzel-Seydim, Z. (2020). Effects of ozonation on apple  
520 juice quality. *International Journal of Fruit Science*, 20(3), 1-9.  
521 <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1822263>
- 522 Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de  
523 crecimiento. In B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savín, M. Arce-Montoya,  
524 G. A. Gómez-Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la*  
525 *biomasa microalgal* (pp. 21-29). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.  
526 <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- 527 Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure  
528 of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.  
529 <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- 530 Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). El pulque: Características  
531 microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova*, 5(8), 135-  
532 146. <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- 533 Chauhan, M., & Negi, P. S. (2024). Ultrasonication and ozone processing of *Syzygium malaccense*  
534 juice for retention of bioactive components. *Journal of Food Science and Technology*, 62,  
535 519-529. <https://doi.org/10.1007/s13197-024-06042-9>
- 536 Contreras-López, E., Félix-Reyes, N. L., González-Olivares, L. G., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-  
537 Ovando, A., Añorve-Morga, J., López-Hernández, B. A., Vélez-Rivera, N., & Ramírez-  
538 Godínez, J. (2023). Aguamiel enhance proteolytic activity and survival of *Lactiplantibacillus*  
539 *pentosus* ABHEAU-05 during refrigerated storage of a fermented milk. *Fermentation*, 9(9),  
540 841. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090841>
- 541 Davis, P. L., & Chace, W. G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas  
542 chromatographic analysis of headspace. *HortScience*, 4(2), 117-118.  
543 <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.4.2.117>
- 544 de la Rosa, O., Flores-Gallegos, A. C., Ascacio-Valdès, J. A., Sepúlveda, L., & Aguilar, C. N.  
545 (2023). Bioprocess development for fructooligosaccharides and carotenoids production using

546 *Agave mead. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 54, 102956.  
547 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102956>

548 Enríquez-Salazar, M. I., Veana, F., Aguilar, C. N., de la Garza-Rodríguez, I. M., López, M. G.,  
549 Rutiaga-Quiñones, O. M., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial  
550 diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A.*  
551 *atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 1003-  
552 1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>

553 Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Okolie, J. A., Mackay, W., Rateb, M., &  
554 Yaseen, M. (2023). Ozone application in different industries: A review of recent  
555 developments. *Chemical Engineering Journal*, 454, 140188.  
556 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140188>

557 Escalante, A., López-Soto, D. R., Velázquez-Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., &  
558 López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage:  
559 Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-18.  
560 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

561 Garcia-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican  
562 fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8, 1-16.  
563 <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00111-6>

564 García-Mateos, M. R., Quiroz-González, B., Corrales-García, J., Ybarra-Moncada, M. C., &  
565 Leyva-Ruelas, G. (2019). Ozone-high hydrostatic pressure synergy for the stabilization of  
566 refrigerated pitaya (*Stenocereus pruinosus*) juice. *Innovative Food Science and Emerging*  
567 *Technologies*, 56, 102187. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102187>

568 Gorzelany, J., Zardzewiały, M., Findura, P., Kapusta, I., Street, Z., & Street, C. (2024). Effect of  
569 ozone gas on selected microbiological, chemical, electrical and organoleptic properties of  
570 craft wheat beers enriched Japanese quince fruit (*Chaenomeles* L.). *Acta Universitatis*  
571 *Cinbinesis*, 28(1), 79-92. <https://doi.org/10.2478/auaft-2024-0007>

572 Guzmán-Pedraza, R., & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science  
573 beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22.  
574 <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>

575 Kim, J. G., Yousef, A. E., & Khadre, M. A. (2003). Ozone and its current and future application.  
576 *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167-218. [https://doi.org/10.1016/S1043-](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)45005-5)  
577 4526(03)45005-5

578 Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol  
579 fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-  
580 401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>

581 Martínez-Zavala, M., Cruz, M., Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Contreras, J. C., Neira-  
582 Vielma, A. A., & Belmares, R. (2023). Develop of agave syrup using emerging technology  
583 by ohmic heating. *Food and Humanity*, 1, 1637-1644.  
584 <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.11.012>

585 Martins-Pinheiro, A., Salla, M. R., & Bolanos-Rojas, M. L. (2019). Tratamiento de aguas  
586 residuales provenientes de industria de productos de limpieza y desinfectantes por  
587 ozonización convencional y catalítica. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 27(2), 223-  
588 235. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052019000200223>

589 Melini, F., & Melini, V. (2021). Impact of fermentation on phenolic compounds and antioxidant  
590 capacity of quinoa. *Fermentation*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010020>

591 Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant  
592 activity. *Redox Report*, 2(3), 161-171. <https://doi.org/10.1080/13510002.1996.11747044>

593 Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity:  
594 A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.  
595 <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

596 Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Lactic acid: A comprehensive review of production to  
597 purification. *Processes*, 11(3), 688. <https://doi.org/10.3390/pr11030688>

598 Pandiselvam, R., Singh, A., Agriopoulou, S., Sachadyn-Krół, M., Aslam, R., Gonçalves-Lima, C.  
599 M., Khanashyam, A. C., Kothakota, A., Atakan, O., Kumar, M., Mathanghi, S. K., &  
600 Mousavi-Khaenegah, A. (2022). A comprehensive review of impacts of ozone treatment on  
601 textural properties in different food products. *Trends in Food Science and Technology*, 127,  
602 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.008>

603 Panigrahi, C., Mishra, Hari, N., & De, S. (2020). Effect of ozonation parameters on nutritional and  
604 microbiological quality of sugarcane juice. *Journal of Food Process Engineering*, 43(11),  
605 e13542. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13542>

606 Rao, W., Fang, Z., Chen, Z., Wu, J., & Fang, X. (2023). Antibacterial mechanism of metabolites  
607 of *Leuconostoc mesenteroides* against *Serratia liquefaciens*. *Lwt*, 187, 115335.  
608 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115335>

609 Rocha-Arriaga, C., & Cruz-Ramirez, A. (2022). Yeast and nonyeast fungi: the hidden allies in  
610 pulque fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100878.  
611 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100878>

612 SAS Institute, Inc. (2002). User's guide (ver. 9) [software]. SAS Institute, Inc.  
613 [https://www.sas.com/es\\_mx/home.html](https://www.sas.com/es_mx/home.html)

614 Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-  
615 phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-  
616 158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

617 Tiwari, B. K., Cullen, P., Brennan, C. S., & O'Donnell, C. P. (2013). Non thermal processing. In  
618 B. K. Tiwari, N. P. Brunton, & C. S. Brennan (Eds.), *Handbook of Plant Food*  
619 *Phytochemicals* (pp. 273-299). Wiley-Blackwell.  
620 <https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch13>

621 Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca  
622 Morales, R., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Escalante, A. (2014). Screening and  
623 characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated  
624 from traditional fermented pulque beverage. *Springer Plus*, 3(1), 1-14.  
625 <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-583>

626 Velázquez-López, A., Covatzin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., & Vela-Gutiérrez, G. (2018).  
627 Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido-lácticas aisladas del pozol tradicional  
628 chiapaneco. *CienciaUAT*, 13(1), 165-178. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>

629 Wang, X., Liu, Q., Han, Y., Zong, W., Ge, Z., & Wei, X. (2024). *Alternaria* mycotoxin degradation  
630 and quality evaluation of orange juice by ozone treatment. *Journal of Food Process*  
631 *Engineering*, 47(8), e14703. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14703>

- 632 Xue, W., Macleod, J., & Blaxland, J. (2023). The use of ozone technology to control  
633 microorganism growth, enhance food safety and extend shelf life: A promising food  
634 decontamination technology. *Foods*, 12(4), 814. <https://doi.org/10.3390/foods12040814>
- 635 Zardzewiały, M., Belcar, J., & Gorzelany, J. (2023). The use of gaseous ozone to reduce the  
636 microbial load of rhubarb (*Rheum L.*) petioles as an additive to craft wheat beers. *Acta*  
637 *Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 27(2), 231-242.  
638 <https://doi.org/10.2478/aucft-2023-0019>
- 639 Zhang, H., Wang, M., & Xiao, J. (2022). Stability of polyphenols in food processing. *Advances in*  
640 *Food and Nutrition Research*, 102, 1-45. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.006>
- 641 Zhao, L. (2019). SAS for mixed models: Introduction and basic applications. *International*  
642 *Statistical Review*, 87(2), 449-450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/insr.12348>
- 643