

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Estandarización de condiciones de producción de pulque a partir de savia de *Agave salmiana***

Por:

**Omar Tapia Romero**

**TESIS**

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:  
**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2016**



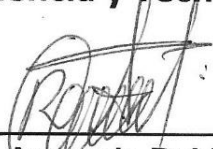
**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**  
**División de Ciencia Animal**

**Estandarización de condiciones de producción de**  
**pulque a partir de savia de *Agave salmiana***

**Por**  
**Omar Tapia Romero**

**Que se somete a la consideración del H. jurado examinador como**  
**requisito parcial para obtener el título de:**

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.**


  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Armando Robledo Olivo**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Mc. Mildred Inna Marcela**  
**Flores Verástegui**

Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Mario Alberto Cruz**  
**Hernández**

Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Dueñez Alanís**  
Coordinador de la División de  
Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Junio del 2016

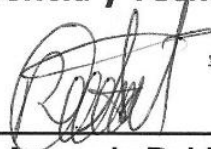
**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**  
**División de Ciencia Animal**

**Estandarización de condiciones de producción de**  
**pulque a partir de savia de *Agave salmiana***

Por  
**Omar Tapia Romero**

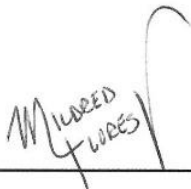
**Que se somete a la consideración del H. jurado examinador como**  
**requisito parcial para obtener el título de:**

**Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.**




\_\_\_\_\_  
**Dr. Armando Robledo Olivo**

Director



\_\_\_\_\_  
**Mc. Mildred Inna Marcela**  
**Flores Verástegui**

Asesor



\_\_\_\_\_  
**Dr. Mario Alberto Cruz**  
**Hernández**

Asesor

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Junio del 2016

Contenido	
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Capítulo I</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Hipótesis</b> .....	3
<b>Objetivos</b> .....	3
<b>1 Objetivo General</b> .....	3
<b>1.1 Objetivo Específico</b> .....	3
<b>Justificación</b> .....	3
<b>Capítulo II</b> .....	5
<b>Antecedentes</b> .....	5
<b>2.1 Pulque una bebida ancestral</b> .....	5
<b>2.2 Variedades de Agave</b> .....	5
<b>2.3 Optimización en la fermentación del aguamiel</b> .....	6
<b>2.4 Fructosacaridos e inulina</b> .....	7
<b>2.5 Características físico químicas del aguamiel y pulque</b> .....	7
<b>Capítulo III</b> .....	10
<b>Metodología</b> .....	10
<b>3.1. Análisis bromatológico del aguamiel</b> .....	10
<b>3.2. Determinación de pH</b> .....	10
<b>3.3. Determinación de solidos solubles totales (°Brix) en aguamiel</b> .....	10
<b>3.4. Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico en aguamiel</b> .....	10
<b>3.5. Determinación de azúcares reductores por el método de DNS</b> .....	11
<b>3.6. Determinación de grasa por el método Soxhlet</b> .....	11
<b>3.7. Determinación de proteína por el método MicroKjeldhal</b> .....	12
<b>3.8. Determinación de cenizas</b> .....	13
<b>3.9. Determinación de ácido láctico en aguamiel</b> .....	13
<b>3.10. Determinación de la densidad en aguamiel</b> .....	13
<b>3.11. Prueba microbiológica</b> .....	14
<b>Pretratamientos previos a la fermentación del aguamiel</b> .....	15
<b>3.12. Metodología del proceso de fermentación</b> .....	15

3.13. Pasteurización.....	15
3.14 Inóculo iniciador de la fermentación.....	15
3.15. Determinación de pH.....	15
3.16. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix) en el proceso de fermentación.....	16
3.17. Determinación de azúcares totales durante el proceso de fermentación. .	16
3.18. Prueba de grado alcohólico. ....	16
Capítulo IV.....	18
Resultados.....	18
4.1. Análisis bromatológico.....	18
4.2. Análisis microbiológico.....	18
4.3. Evaluación de la cinética del proceso de fermentación sin agitación.....	18
4.4. Evaluación de la cinética del proceso de fermentación con agitación a 125 rpm.....	20
4.5. Tablas de análisis de varianza del proceso de fermentación.....	22
4.6. Gráficos de Pareto sobre la relación de la agitación en diferentes factores del proceso de fermentación. ....	24
4.7. Graficas de principales efectos de agitación en el proceso de fermentación. ....	25
4.8. Gráficas de interacción entre un proceso con y sin agitación en el proceso de fermentación.....	26
Capítulo V.....	27
Discusiones. ....	27
Capítulo VI.....	29
Conclusiones. ....	29
Capítulo VII.....	30
Bibliografía.....	30
Anexos. ....	32

## Índice de figuras.

Ilustración 1. Comportamiento del pH y °Brix. ....	19
Ilustración 2. Comportamiento del contenido de azúcares totales y producción de alcohol. .....	19
Ilustración 3. Gráfica de pH y °Brix.....	20
Ilustración 4. Gráfica de azúcares totales y porcentaje de alcohol. ....	20
Ilustración 5. Gráfica del comportamiento el pH y °Brix.....	21
Ilustración 6. Gráfica de azúcares totales y porcentaje de alcohol. ....	21
Ilustración 7. Comportamiento del pH y °Brix. ....	22
Ilustración 8 comportamiento de los azúcares totales y porcentaje de alcohol. ....	22
Ilustración 9. Gráfica de relación °Brix y agitación.....	24
Ilustración 10. Gráfica de relación pH y agitación.....	24
Ilustración 11. Gráfica de relación azúcares totales y agitación.....	24
Ilustración 12. Gráfica de relación porcentaje de alcohol y agitación. ....	24
Ilustración 13. Gráfica de principales efectos en °Brix. ....	25
Ilustración 14. Gráfica de principales efectos en pH. ....	25
Ilustración 15. Gráfica de principales efectos en azúcares totales. ....	25
Ilustración 16. Gráfica de principales efectos en el porcentaje de alcohol. ....	25
Ilustración 17. Gráfica de interacción en °Brix.....	26
Ilustración 18. Gráfica de interacción en pH.....	26
Ilustración 19. Gráfica de interacción en azúcares totales. ....	26
Ilustración 20. Gráfica de interacción en porcentaje de alcohol. ....	26

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1 de Parámetros a considerar para determinar la calidad del aguamiel según la NMX-V-022-1972.</b> ....	9
<b>Tabla 2 Diseño de experimentos Plackett-Burman</b> .....	15
<b>Tabla 3. Análisis bromatológico de aguamiel.</b> .....	18
<b>Tabla 4. Resultados de análisis de presencia de patógenos.</b> .....	18
Tabla 5 Análisis de varianza en la relación agitación y °Brix. ....	22
<b>Tabla 6 Análisis de varianza en la relación agitación y pH.</b> .....	23
<b>Tabla 7. Análisis de varianza en la relación agitación y azúcares totales.</b> .....	23
<b>Tabla 8. Análisis de varianza en la relación agitación y porcentaje de alcohol.</b> .....	23

**Resumen.**

Durante el desarrollo de esta investigación se buscó realizar un estándar del proceso de fermentación del aguamiel a pulque, mediante factores controlados como son agitación, temperatura y concentración de inóculo. El pulque es una bebida obtenida de la fermentación de la savia también conocido como aguamiel que se extrae de diferentes variedades de agave; a partir del aguamiel de *Agave salmiana* se realizó un análisis bromatológico del cual se obtuvieron datos del contenido de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico y reductores a través del método por DNS, para la cuantificación de proteína se realizó el método microKjendhal, para determinar el contenido de grasa se llevó a cabo el método Soxhlet., las cenizas se hicieron por método gravimétrico y el ácido láctico por titulación. Se realizó también un análisis microbiológico para determinar la presencia de patógenos en agares específicos EMB y VBA; con base en un diseño de experimentos Plackett-Burman, se realizaron diferentes fermentaciones con diferentes factores como fueron agitación y temperatura así también como el porcentaje de inóculo para iniciar la fermentación, cada una de éstas cuenta con sus respectivas gráficas en las cuales se evaluaron los parámetros de pH, °Brix, azúcares totales y alcohol. Obteniendo como resultados de la presente investigación, presencia de altos contenidos de carbohidratos en aguamiel, nula presencia de patógenos, y una alta producción de alcohol en procesos de fermentaciones sin agitación.

**Palabras clave:** pulque, aguamiel, fermentación, *Agave salmiana*.

Correo electrónico; Omar Tapia Romero, [tapiaomar499@gmail.com](mailto:tapiaomar499@gmail.com)



## Capítulo I

### Introducción.

El pulque es el producto de la fermentación de la savia, mejor conocida como aguamiel, obtenida de diferentes variedades de agave, esta savia está constituida por altas concentraciones de fructuosa que le dan ese sabor dulce que la caracterizan, el color ambarino presente en esta bebida, dentro de su contenido tiene carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales.

Dentro del contenido de carbohidratos se encuentra la inulina y algunos derivados (oligofruccosa, fructooligosacáridos) que son generalmente llamados fructanos, constituidos por cadenas lineales de fructuosa. Es de vital importancia hacer hincapié a que se encuentra en diferentes tipos de vegetales, en este caso se hablará del *agave salmiana*, del cual se extrae el aguamiel que posteriormente se fermenta y se transforma en pulque; durante años esta bebida se consumía a lo largo de todo el país en especial en la zona centro, que incluye a los estados de Puebla, Hidalgo, México, Tlaxcala, Morelos y Michoacán (García, 1994; Ramírez y Gentry, 1982).

Conforme el paso del tiempo se le dio mala fama, al surgir diferentes teorías del método de elaboración e higiene; durante la Revolución Mexicana y la repartición de tierras se perdieron haciendas dedicadas a la producción de agave para la elaboración de pulque y esto provocó que el abastecimiento de éste fuera disminuyendo, así que los consumidores buscaban otras opciones haciendo que su presencia en el mercado se perdiera notoriamente; por otra parte la industria cervecera se estableció en el país haciendo aún más precario el mercado del pulque, de esta manera se sustituyó al pulque por la cerveza y otras bebidas alcohólicas en especial los destilados; haciendo que el pulque no pasara de ser una bebida típica popular (Loyola-Montemayor 1956; Ramírez Rancaño 2000).

Algunas investigaciones han demostrado que el pulque posee una gran variedad de propiedades nutricionales y funcionales por sus altas concentraciones de carbohidratos y aminoácidos, en algunos lugares se les da a los niños desde temprana edad para evita el riesgo de contraer anemia, es tan fuerte su impacto que en algunas localidades de escasos recursos sin tener acceso al agua usan el aguamiel para compensar esta deficiencia hídrica.

Actualmente el pulque ya se vende envasado y esto le da un valor agregado, aunque la mayoría de los consumidores prefieren beberlo fresco, el producto enlatado por otra parte no es en su mayoría de gran agrado por la pérdida de algunas características sensoriales durante el proceso de transformación.

Se espera que con el paso del tiempo tenga más auge en el país, así también que se posicione en el mercado internacional esto con la ayuda de la investigación de

alimentos funcionales y se mencionen los beneficios del consumo de pulque y aguamiel.

Durante años en la región norte del país especialmente en las zonas rurales se ha consumido el pulque, y otros derivados del aguamiel y de la planta de agave. Por lo que, se busca establecer un procedimiento estándar que ayude a la transformación del aguamiel a pulque que beneficie a estos productores haciendo que su producto sea más inocuo y reconocido. Que en la zona urbana las personas no lo consumen por su precaria notoriedad en el mercado.

El estudio que se presenta tiene como fin el establecer un proceso estándar en la fermentación del aguamiel a pulque, si se toma en cuenta que no solo es una bebida alcohólica sino también tienen otras funciones que pueden beneficiar a los consumidores.

### **Hipótesis.**

Las condiciones de agitación y concentración de inóculo, afectarán la elaboración de una bebida fermentada a partir de aguamiel.

### **Objetivos.**

#### **1 Objetivo General.**

Estandarizar las condiciones de agitación y concentración de inóculo para la elaboración de pulque a partir de aguamiel obtenida de *Agave salmiana*.

#### **1.1 Objetivo Específico.**

1. Caracterizar bromatológica el aguamiel antes y después de fermentar.
2. Determinar patógenos de la fermentación antes y después
3. Evaluar de manera cinética el proceso de fermentación.
4. Evaluar de manera cinética el proceso de elaboración de pulque.

### **Justificación.**

En la actualidad en nuestro país se contemplan varios problemas uno de ellos es el tema de la pobreza e inseguridad alimentaria, lo cual hace que el sector de la población rural no tenga un sustento económico seguro, haciendo que los

habitantes de ésta, busquen fuentes de empleo en las grandes ciudades dejando de dedicarse a sus actividades en el campo.

Una de estas actividades es la extracción de aguamiel, de la cual se produce el pulque que es una de las bebidas típicas que se consume en la zona sureste del estado de Coahuila, siendo una de las fuentes de ingresos para las personas que habitan este lugar.

Durante el desarrollo de esta investigación se buscará realizar un estándar de producción de pulque, en el cual la carga microbiana pueda ser controlada y ésta sea benéfica para el consumidor, El diseño de esta investigación está dirigido para los productores que puedan ser beneficiados y desarrollen su producto con un valor agregado para el mercado.

## Capítulo II

### Antecedentes.

#### 2.1 Pulque una bebida ancestral

El pulque es probablemente la bebida alcohólica mexicana más antigua y tradicional, preparada y consumida desde tiempos prehispánicos. Debido a su gran importancia histórica, religiosa, social, médica y económica, es la bebida más ampliamente estudiada desde los puntos de vista antropológicos y científicos (Loyola-Montemayor 1956; Godoy et al., 2003).

Tras ser conquistados los mexicas fueron adoptando las formas de vida de los españoles dejando a un lado las propias creencias, la propia vestimenta y la propia gastronomía, aunque no fue un cambio total. En nuestros días se tiene que solo pequeñas partes de la población mexicana conocen y conservan costumbres que se están extinguiendo. Un ejemplo de ello es el cultivo del agave que por mucho tiempo ha sido fuente de distintos productos que de él se obtienen entre los que destacan el tequila, mezcal, y otros que no son muy conocidos como el quiote, pulque y aguamiel (Gonçalves de Lima 1978 , 1990 ; Soberón -Mora 1998).

Durante años se han desarrollado estudios, para hacer que esta bebida pueda realizarse con un proceso estándar, algunas compañías ya lo manejan y tiene producto en el mercado internacional, el problema es que en el mercado nacional no son muy reconocidos.

#### 2.2 Variedades de Agave

Los magueyes productores de pulque en el Valle de México son: *Agave teometl* Zucc., *A. weberi* Cels., *A. altísima* Jacobi., *A. compliata* Trel., *A. gracillispina* Englem., *A. malliflua* Trel., *A. quitifera* Trel. *A. crassispina* Trel., *A. mapisaga* Trel. *A. americana* L., *A. salmiana* Otto ex Salm. Las zonas productoras de pulque se encuentran principalmente en Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y Puebla, aunque también se le encuentra marginalmente en San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato, Veracruz y Oaxaca (García, 1994; Ramírez y Gentry, 1982).

Estas son las variedades que se aprovechan para la elaboración de pulque, cada una de ellas dan características específicas. En los ejidos del municipio de Saltillo Coahuila, la variedad de *Agave salmiana* es la más común en esta región y de la cual se extrae el aguamiel para su fermentación. Cabe señalar que no se tiene un control adecuado durante la misma, de tal forma que es indispensable el continuo desarrollo de investigaciones para la elaboración de una bebida con las características adecuadas para su consumo.

### 2.3 Optimización en la fermentación del aguamiel.

Durante años se ha buscado la estandarización del proceso, sin embargo, Néctar del Razo, en Tlaxcala, y Desarrollo Agropecuario del Altiplano, en Puebla, exportan y enlatan pulque y lo exportan a diferentes países de todo el mundo. En ambas compañías, el proceso de elaboración tradicional ha sido modificado para obtener un producto estable con una, larga vida útil, que se vende blanco, es decir, normal o añadido con frutas (Loyola-Montemayor 1956; García-Mendoza 1995 , 1998).

Se han purificado algunos microorganismos como *Zymomonas mobilis*, microorganismo productor de etanol durante la fermentación del aguamiel. Los primeros estudios microbiológicos realizados por Sánchez-Marroquín durante 1946-1957, resultaron en una descripción de la microbiota del pulque y la propuesta de los microorganismos esenciales para la fermentación del mismo: *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; así como la función de cada uno de ellos en buen estado durante 24 horas, ya que los procesos bioquímicos siguen con la fermentación por el contenido de microorganismos.

Algunas de las características que tiene el pulque le permite ser considerado como un alimento funcional; el aguamiel y el pulque se pueden considerar como productos probióticos debido a la presencia de LAB, como *L. acidophilus* y *L. mesenteroides* (Escalante et al 2004, 2008. Campos 2010), así como *Z. mobilis*, que tiene una actividad antagonista particularmente contra bacterias patógenas y especies de hongos y levaduras (Wuanick 1970; Gonçalves de Lima 1978), también se puede considerar como prebióticos, debido a su contenido de fructanos y oligofructanos (Ortiz-Basurto et al 2008;. Ramírez-Higuera 2009). Varias evidencias arqueológicas sugieren que el pulque se ha utilizado desde la época prehispánica como enema. Recientemente se ha demostrado que esta práctica puede haber tenido efectos beneficiosos sobre la salud de los seres humanos, debido al enriquecimiento del tracto digestivo con bacterias probióticas potenciales (Lemus 2006).

Según el Grupo Del Razo, que se inició la producción de pulque enlatado en 1980 en el estado de Tlaxcala para cumplir con la demanda de pulque en los Estados Unidos, el mercado ya había crecido a más de 100 000 L / mes por el inicio del siglo XXI El proceso de enlatado del pulque Del Razo incluye conservación aséptica y un proceso controlado para conservar las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del pulque. Después de varios intentos infructuosos, el grupo Del Razo finalmente desarrolló un proceso efectivo y ahora exporta a los Estados Unidos la marca "Pulque Hacienda 1881" en diversas presentaciones de sabor, así como el pulque natural o llanura. Según Del Razo, la modificación de su proceso de fermentación ha reducido el mal sabor tradicional asociado con pulque y también su viscosidad, lo que significa que ni *Z. mobilis* ni *L. mesenteroides* (ni por lo menos las cepas salvajes) se incluyen en el proceso. Otras marcas incluyen

Jícara, Malinche, Pulquemex y Pulque Azteca, que también compiten por el mercado de América del Norte

#### **2.4 Fructosacaridos e inulina.**

La inulina es un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales, frutas y cereales. En la actualidad, a nivel industrial se extrae de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) y se utiliza ampliamente como ingrediente en alimentos funcionales. La inulina y sus derivados (oligofructosa, fructooligosacáridos) son generalmente llamados fructanos, que están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa. En una amplia variedad de productos alimenticios se usa la inulina y sus derivados como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante o depresor del punto de congelación (Madrigal L y Sandrogis E 2007).

La propiedad de la inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, definido por su capacidad selectiva de estimular el crecimiento de un grupo de bacterias en el colon (*bifidobacterias* y *lactobacilos*), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (ejemplo: *E. coli* y bacterias de la especie *Clostridium spp.*). Entre otras propiedades beneficiosas a la salud de la inulina, se mencionan: el refuerzo de las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), el aumento de la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica.

Después del almidón, los fructanos son los polisacáridos no estructurales más abundantes en la naturaleza.

#### **2.5 Características físico químicas del aguamiel y pulque.**

El aguamiel es un líquido dulce, éste puede ser ácido o ligeramente alcalino, incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en carbohidratos y proteínas, (Ramírez y Gentry; 1982). El contenido de sacarosa en el jugo de la planta adulta (penca o piña) es apreciable y, por lo tanto, se trata de un substrato que puede ser empleado como materia prima en la industria de la fermentación; para la obtención de proteína de levadura; obtención de vitaminas mediante microorganismos; obtención de dextranas para uso alimenticio o clínico; mieles y jarabes de fructosa y producción de ácidos orgánicos mediante microorganismos (Sánchez, 1979).

Como ya se ha descrito, el aguamiel es una savia rica en azúcar que contiene sacarosa, fructosa, glucosa y fructooligosacáridos con un pH relativamente ácido

(7.5 a 4.5), mientras que el pulque es más ácido (pH 4.3 a 3.5), tiene un grado alcohólico de (4 % -6 %), y es una bebida viscosa (Banco de Normas Mexicanas 2010b). El aguamiel fresco utilizada para iniciar la fermentación por lo general tiene un pH inicial de 6.0, se reduce a 4,5 después de la mezcla con la semilla, esto al final del proceso después de 6 horas de fermentación.

De acuerdo a Campos-Mendiola 2002, el aguamiel presenta un porcentaje de humedad elevado (86%) y una proporción de sólidos solubles de 10.85 °Brix. El contenido de proteína soluble es de 5.3%. La sacarosa es el azúcar que está presente en mayor proporción.

El aguamiel constituye un medio favorable para la proliferación de numerosos microorganismos asociados con el medio que pueden estar presentes en las paredes del cajete, también pueden ser incorporados con las herramientas de raspado o extracción, del polvo, o de insectos tales como moscas de la fruta. Esta microbiota complementa el arranque presente en el recipiente de fermentación para llevar a cabo una serie de procesos fermentativos distintivos que caracterizan al pulque: ácido láctico y acético, producción de etanol, producción de polisacáridos extracelulares, EPS (Sánchez -Marroquín y Esperanza 1953; Loyola-Montemayor 1956; Gonçalves de Lima 1990; García-Garibay y López Munguía 1993). Como se sabe el aguamiel es un excelente medio para el desarrollo de bacterias, aunque también puede tener presencia de patógenos entre estos algunas bacterias como *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus áureos*, *Listeria motocygenes* así como también de algunos hongos. Esto no quiere decir que la savia los tenga, sino que durante el proceso tuvo contacto con una superficie contaminada o por un mal manejo desde su recolección.

En la Tabla 1, se presentan los valores para diversas características que determinan la calidad del aguamiel

**Tabla 1 de Parámetros a considerar para determinar la calidad del aguamiel según la NMX-V-022-1972.**

Especificaciones	TIPO I		TIPO II
	Mínimo	Máximo	Menor
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baume (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20°	59	100	27
Sólidos totales en 100 mL	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 mL	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 mL	2	3	3
Gomas (en Glucosa) g/100 mL	2	6	0.20
Proteínas mg/100 mL	300	600	100
Cenizas mg/10 mL	300	430	180
	NO MAYOR DE:		
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico)	0.9	1.03	4



## Capítulo III

### Metodología.

#### 3.1. Análisis bromatológico del aguamiel.

#### 3.2. Determinación de pH.

Para esta determinación, se colocaron 100 mL de la muestra de aguamiel en un vaso de precipitado. Se sumergió el potenciómetro (HANNA Instruments, pH 213) con la parte del electrodo dentro del líquido y se tomó la lectura. La temperatura se registró de igual manera, tomando en cuenta que el electrodo no debe tener contacto con las paredes del recipiente.

#### 3.3. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix) en aguamiel.

La determinación de sólidos solubles se realizó directamente en el refractómetro (ATAGO POCKET PAL 1). Como primer paso se esperó a que el aguamiel llegara a la temperatura ambiente. Posteriormente con la ayuda de un gotero se depositó una cantidad de 0.2 mL (una gota) y se tomó directamente la lectura en el refractómetro. Los resultados fueron expresados en °Brix.

#### 3.4. Determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico en aguamiel.

*Preparación de la solución fenol-sulfúrico.*

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 0.2 g de solución de fenol. De igual forma, con la ayuda de un embudo, se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico (Fermont) concentrado. Así se obtuvo la solución de fenol-sulfúrico.

*Preparación de la solución madre y curva de calibración.*

Para la preparación de la solución madre, se pesó 0.1g de sacarosa (Jaimek), se aforó con agua destilada en un matraz aforado de 10 mL agitando el contenido. Para la obtención de la curva se usaron seis tubos con un rango de curva que iba de 0.2 a 1 mL de solución madre. Al tener los seis tubos de ensaye con las diluciones, se colocaron en baño de hielo. Agregando lentamente y por la pared de los tubos 2 mL de solución fenol-sulfúrico. Posteriormente se cambiaron a un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Los tubos se atemperaron, se vaciaron las mezclas en celdillas y se leyeron las absorbancias dentro del espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS YS 10 UV) de cada una de las diluciones a 480 nm.

*Determinación de azúcares totales de las muestras de aguamiel.*

Colocando 1 mL de muestra en cada uno de los nueve tubos de ensaye estando dentro de un baño de agua de hielo, se le agregaron 2 mL de solución fenol-sulfúrico a cada uno. Posteriormente se pusieron en un baño de agua hirviendo

por 5 minutos. Los tubos se atemperaron y se vació la mezcla en las celdillas. Para finalizar se midió la absorbancia de cada uno de los tubos a 480 nm.

### **3.5. Determinación de azúcares reductores por el método de DNS.**

La preparación del reactivo DNS (3,5 dinitrosalicílico) se realizó precalentando 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitados a 50°C con agitación, colocando 10g de DNS, 10g de hidróxido de sodio, 200g de tartrato de sodio y potasio, 2g de fenol y 0.5g de sulfito de sodio, todo en ese orden. Se aforó a un litro con agua destilada. Al terminar de aforar, la solución se guardó en dos frascos de vidrio con capacidad de 500 mL. Se forraron con aluminio y almacenaron en refrigeración.

*Preparación de la solución madre y curva de calibración.*

Se pesó 0.01g de fructosa y se mezcló con agua destilada en un matraz aforado de 10 mL agitando su contenido. Para la obtención de la curva se usaron seis tubos de ensaye con un rango de curva de 0.2 a 1 mL. Se agregó 1 mL de DNS a cada tubo, hecho esto se colocaron en baño de agua hirviendo por 5 minutos. Para terminar la reacción, los tubos se colocaron en un baño de hielo por 5 minutos. Pasado esto se dejaron atemperar por 5 minutos para finalmente leer absorbancia a 540 nm.

*Determinación de azúcares reductores de la muestra de aguamiel.*

Se diluyó 1 ml de aguamiel en 100 mL de agua destilada, se colocó 1 mL de muestra en cada uno de los tres tubos de ensaye, se agregó 1 mL de reactivo DNS a cada tubo, hecho esto se colocaron en baño de agua hirviendo por 5 minutos. Para terminar la reacción los tubos se colocaron en un baño de hielo por 5 minutos. Pasado esto se dejaron atemperar por 5 minutos para finalmente leer absorbancia a 540 nm.

### **3.6. Determinación de grasa por el método Soxhlet.**

Usando guantes de látex se pesaron 0.1g de muestra de aguamiel. Se agregó la muestra en un trozo de papel filtro de 1x2 cm el cual se dobló en forma de un abanico, colocándolo dentro de un cartucho hecho con papel filtro. Con la ayuda de un horno con aire forzado (Quicy Lab) se colocaron tres matraces bola con tres esferas de vidrio en su interior, poniendo a peso constante en un desecador. Con la ayuda de una probeta se agregaron 100 mL de hexano en cada matraz, colocando los cartuchos con la muestra dentro del extractor. Se ensambló por completo el equipo de extracción Soxhlet, los matraces bola se colocaron en cada una de las parrillas correspondientes, los extractores se ajustaron, después los condensadores, se aseguró que las mangueras se colocaran bien y llegaran a la bañera donde se tiene agua y hielo, los cuales se mantuvieron durante todo el proceso. Encendiendo la bomba de agua posteriormente las parrillas, el proceso

de extracción duró 2 horas. Se apagó el equipo, se desarmó y se extrajo el hexano sobrante. Los matraces se colocaron en el horno de aire forzado para retirar los residuos de hexano y que estuviesen a peso constante para evaluar los resultados.

### **3.7. Determinación de proteína por el método MicroKjeldhal.**

#### *Preparación de reactivos*

Para la preparación de un litro de mezcla digestora se usaron 25 g de sulfato de potasio, 10 g de óxido de mercurio rojo, 1 litro de ácido sulfúrico, 25 mL solución saturada de cobre. La solución saturada de cobre se preparó de la siguiente manera: a 100 mL de agua destilada se le agregó sulfato de cobre hasta que ya no se diluía, al final de esto se agregaron 10 g de mezcla de reactiva de selenio. Para la obtención de la solución digestora, todo lo anterior se agrega a un matraz aforado de 1 L, a excepción del ácido sulfúrico el cual se usó para aforar al final.

La preparación de la solución de hidróxido de sodio al 50%, se pesaron 500 g del reactivo, se agregaron 900 mL de agua, se agitó hasta disolver. Se pesó 0.1 g de fenolftaleína y se agregó a la solución, se agitó y aforó a un litro. También se preparó ácido bórico al 2.2%. Se pesaron 22 g, se disolvieron en 900 mL de agua caliente, se dejó enfriar y se aforó, a un litro. La preparación de ácido sulfúrico N=0.025, se realizó midiendo 0.6875 mL de reactivo. Se le agregaron 900 mL de agua, se agitó y se aforó a un litro. La preparación del indicador mixto verde de bromocresol y rojo de metilo se realizó de la siguiente manera: se pesaron 0.5 g de indicador rojo de metilo y 0.1 g de indicador verde de bromocresol, se disolvieron los dos indicadores en alcohol al 95% y aforaron en 100 mL con alcohol.

Para este método se necesitó pesar 0.05 g de muestra y se agregaron al matraz, añadiendo 10 mL de solución digestora. Se colocaron en el aparato de digestión por una hora y media, hasta que se tenga un color azul verdoso. Posteriormente se llevó al aparato de microKjeldhal para que se destilara. En la parte superior del aparato se encuentra un bulbo donde se agregó la muestra ya digerida. Posteriormente que entró al sistema se pasa a la destilación y se agregaron 10 mL de hidróxido de sodio al 50% lentamente hasta el cambio de color dentro de microKjeldhal. Enseguida se extraen 80 mL del destilado. Posteriormente se le agregaron tres gotas de indicador mixto verde de bromocresol y rojo de metilo. Hecho esto se titula con ácido sulfúrico N= 0.025.

### **3.8. Determinación de cenizas.**

Se usaron tres crisoles de porcelana los cuales se colocaron dentro de una mufla (Termo Scientific, Lineder blue M) por una hora para que llegaran a peso constante, al término de este tiempo con el uso de las pinzas para crisol se sacaron y se colocaron dentro del desecador hasta su uso. Se colocaron 10g de aguamiel en cada uno de los crisoles ya con la muestra dentro de ellos se colocaron en la mufla por dos horas y media a una temperatura de 550°C hasta que se obtenga una ceniza de color blanco o grisáceo. Se volvieron a transferir al desecador para que alcanzaran la temperatura ambiente y fueron pesados.

### **3.9. Determinación de ácido láctico en aguamiel.**

Para la obtención del porcentaje de ácido láctico en el aguamiel se colocaron 20 mL de esta en un matraz Erlenmeyer. Se añadieron tres gotas de indicador fenolftaleína concluido esto se tituló con hidróxido de sodio al 0.1 N hasta que presentó un color rosado que se mantuvo por 20 segundos.

### **3.10. Determinación de la densidad en aguamiel.**

Para medir la densidad fue necesaria la ayuda del picnómetro, la balanza analítica y un termómetro.

Se tomó el picnómetro con guantes para evitar poner peso adicional proveniente de la grasa de los dedos u otro tipo de materia o sudor. Se procedió a pesar el picnómetro vacío, se tomó el peso en gramos, se llenó el picnómetro con el aguamiel carbonatada, se retiró el exceso de aguamiel con un pañuelo suave, se volvió a tomar el peso en gramos del picnómetro lleno y para la determinación de la densidad se utilizó la formula siguiente  $D = \frac{(P-PS)}{25.120ml}$  donde;

P=picnómetro con muestra

PS= picnómetro sin muestra

V= volumen del picnómetro = 25.120ml

Por último, se expresan los resultados en g/ml

### 3.11. Prueba microbiológica.

La determinación de patógenos se realizó con medios de cultivo específicos para los cuales se preparó agar verde brillante y agar Vogel Johnson.

#### *Preparación de agua peptonada para diluciones.*

En un vaso de 100 mL se agregaron 90 mL de agua destilada, 1 g de peptona de caseína y 8.5 g de cloruro de sodio mezclando hasta su total dilución. Con la ayuda de 10 tubos de ensaye con taparrosca a los cuales se les agregaron 9 mL de agua peptonada a cada uno. Se les tapó no por completo y se esterizaron por 15 minutos a 121°C dentro del autoclave. Al terminar la esterilización se marcaron de la siguiente forma  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y se realizó una dilución seriada a partir de 1 mL de aguamiel que se agregó al tubo marcado  $10^{-1}$ . Hecho esto se introdujeron a la incubadora a 35°C por 24 horas.

En el caso del agar verde brillante se usó para la identificación *Salmonella* y *E. Coli*. Para esto se suspendieron 25 g de agar en 500 mL de agua destilada todo dentro de un matraz Erlenmeyer. Se dejó reposar por 5 minutos, se mezcló y se dejó en ebullición de 2 a 3 minutos. Pasado ese tiempo se colocó un tapón hecho de gasa y algodón se introdujo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Al término de la esterilización en el autoclave se esperó a que el medio se enfriara un poco. Se tomaron 20 cajas Petri a las cuales se les agregó aproximadamente 20 mL de medio (todo esto dentro de una campana con flujo de aire laminar) (Scientific/Scorpion). Ya que el agar se solidificó, las cajas Petri fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de entre 6 y 8°C. Teniendo los tubos con las diluciones seriadas que ya estuvieron por 24 horas en la incubadora, se toma 1 mL de cada dilución y se agrega en la superficie del agar. Marcando la fecha, número de dilución, la muestra y el agar usado. Incubar por 24 horas a 45°C.

Para la preparación del agar Vogel Johnson el cual se usó para identificar la presencia de *Staphylococcus* se realizó lo siguiente: dentro de un matraz Erlenmeyer se suspendieron 31 g de agar en 500 mL de agua destilada, se mezcló y fue dejado por 1 minuto hirviendo. Al término del minuto, se introdujo el matraz en la autoclave para esterilizar a 121°C por 15 minutos. Al término de la esterilización se esperó a que el medio se enfriara un poco. Se tomaron 20 cajas Petri a las cuales se les agregaron aproximadamente 20 mL de medio (todo esto dentro de una campana con flujo de aire laminar) (Scientific/Scorpion). Ya que el agar se solidificó las cajas Petri fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de entre 6 y 8°C. Teniendo los tubos con las diluciones seriadas que ya estuvieron por 24 horas en la incubadora, se tomó 1 mL de cada dilución y se agregó en la superficie del agar. Marcando la fecha, número de dilución, la muestra y el agar usado. Incubar por 24 horas a 45°C.

### **Pretratamientos previos a la fermentación del aguamiel.**

#### **3.12. Metodología del proceso de fermentación.**

Las condiciones a las cuales se colocaron las muestras se obtuvieron mediante un diseño de experimentos Plackett-Burman con tres factores (Agitación, temperatura y relación de pulque-aguamiel) como se muestra en la Tabla 2. Cada uno de los factores se realizó en dos niveles con tres réplicas por experimento.

**Tabla 2 Diseño de experimentos Plackett-Burman**

<b>Orden</b>	<b>Agitación</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Relación Pulque-Aguamiel</b>
1	Sin	15	1%
3	Con	15	10%
5	Sin	15	1%
8	Con	15	1%
9	Sin	15	10%
12	Con	15	10%

#### **3.13. Pasteurización**

Se colocaron 150 mL de aguamiel en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se colocó en una parrilla eléctrica y se elevó la temperatura hasta llegar a los 85°C y se mantuvo por 25 segundos a esa temperatura. Pasado este tiempo, se colocó el matraz en un baño de agua con hielo para efectuar un choque térmico.

#### **3.14 Inóculo iniciador de la fermentación.**

Este se colocó en la proporción que se describe en la Tabla 2. Se hizo con la ayuda de una micropipeta y puntillas estériles. El cultivo iniciador (pulque) se agregó al aguamiel pasteurizado.

Se colocaron en el panel de control del Incubador Shaker (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC. Innova 44) las condiciones que se requerían en cada proceso de fermentación, según el diseño de experimentos.

Los parámetros a evaluar durante la fermentación fueron los siguientes: pH, sólidos solubles, grado alcohólico, azúcares totales (estas dos últimas se realizaron por triplicado).

#### **3.15. Determinación de pH.**

Para la determinación del pH se colocaron 100 mL de la muestra de aguamiel en un vaso de precipitado. Se sumergió el potenciómetro (HANNA Instruments/pH 213) con la parte del electrodo dentro del líquido y se tomó la lectura. La temperatura se registró de igual manera, tomando en cuenta que el electrodo no debe tener contacto con las paredes del recipiente.

### **3.16. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix) en el proceso de fermentación.**

La determinación de sólidos solubles se realizó directamente en el refractómetro (ATAGO POCKET PAL 1). Como primer paso se esperó a que el aguamiel llegara a la temperatura ambiente. Posteriormente con la ayuda de una micropipeta y usando puntillas estériles se depositó una cantidad de 2 mL y se tomó directamente la lectura en el refractómetro. Los resultados fueron expresados en °Brix.

### **3.17. Determinación de azúcares totales durante el proceso de fermentación.**

Colocando 1 mL de muestra en cada uno de los nueve tubos de ensaye estando dentro de un baño de agua de hielo, se le agregaron 2 mL de solución fenol-sulfúrico a cada uno. Posteriormente se pusieron en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Los tubos se atemperaron, se vaciaron las mezclas en las celdillas. Para finalizar se midió la absorbancia de cada uno de los tubos a 480 nm. Se tuvo que hacer un blanco por día de toma de muestra. Este se hizo de igual manera que los demás a diferencia que se le colocó agua destilada a cambio de aguamiel.

### **3.18. Prueba de grado alcohólico.**

Para este análisis se prepararon las siguientes soluciones: solución de dicromato de potasio al 0.57% y solución de carbonato de potasio al (30%)

#### *Solución dicromato de potasio 30%*

Para la preparación de esta solución se pesaron 3.75 g de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_2$ ). Se disolvieron en 150 mL de agua destilada (todo esto dentro de un matraz Erlenmeyer). Se colocó en un baño de hielo y se agregaron 280 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del matraz, agitando suavemente. Se esperó a que alcanzara la temperatura ambiente y se llevó a un volumen de 650 mL con agua destilada.

#### *Solución saturada de carbonato de potasio*

Se pesaron 112 g de carbonato de potasio anhidro ( $K_2CO_3$ ) se colocó cuidadosamente dentro de un matraz de aforación de 100 mL, y se aforó con agua destilada.

#### *Determinación de grado alcohólico.*

En un tubo de ensaye de 9 mL (Tubo A) se colocaron 2 mL de dicromato de potasio y 2 mL de agua destilada. En un tubo de ensaye de 22 mL (Tubo B) se colocaron 1 mL de solución saturada de carbonato de potasio. Se colocó el tubo de ensaye A dentro del tubo B, y al finalizar esta maniobra se colocó 1 mL de muestra en el tubo B. Se tapó el tubo B con parafilm y se mezcló con movimientos rotatorios sobre una superficie plana. Se dejó reposar por 60 minutos. Se sacó el

tubo A y se leyó su absorbancia a 600 *nm* en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS YS 10 UV).

*Preparación de curva de calibración.*

Esto se realizó usando alcohol etílico al 96%. Para la obtención de la curva se usaron seis tubos con un rango de 0.2 a 1 mL de alcohol. Al tener todos los tubos con las diluciones correspondientes, se tapó el tubo B con parafilm y se mezcló con movimientos rotatorios sobre una superficie plana. Se dejó reposar por 60 minutos. Se sacó el tubo A y se leyó su absorbancia a 600 *nm* en el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS YS 10 UV).



## Capítulo IV

### Resultados

#### 4.1. Análisis bromatológico

Los siguientes datos que se presentan en la Tabla 3 se obtuvieron del análisis bromatológico del aguamiel. Los cuales en comparación con la tabla de las características del aguamiel se establece que es del tipo dos menor.

Tabla 3. Análisis bromatológico de aguamiel.

Parámetro	Valor
	Promedio
Porcentaje de azúcares totales	30.26±0.779
Porcentaje de azúcares reductores	4.476±1.317
Porcentaje de proteína	1.75±0
Porcentaje de grasa	2.34±1.211
Cenizas	0.428±0.0018
°Brix	11±1.743
pH	4.77±0.025
Ácido láctico	0.544±0.0045
Densidad.	1.03464 g/mL

#### 4.2. Análisis microbiológico.

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la presencia de microorganismos patógenos tales como *Salmonell* y *E. Coli*.

Tabla 4. Resultados de análisis de presencia de patógenos.

Medio	Dilución				
	control	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
EMB	-	-	-	-	-
VBA	-	-	-	-	-
Vogel Johnson	-	-	-	-	-

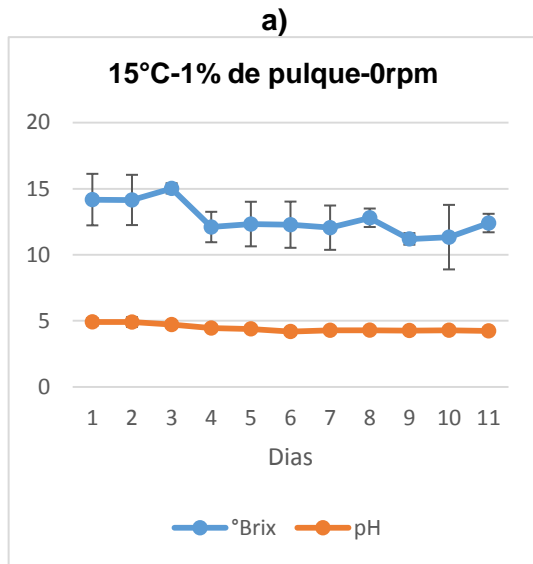
(-) Presencia Negativa

(+) Presencia Positiva

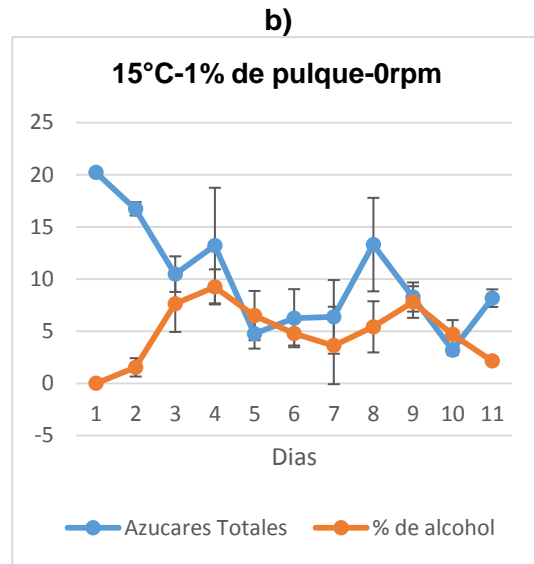
#### 4.3. Evaluación de la cinética del proceso de fermentación sin agitación.

1. Los parámetros en la fermentación sin agitación fueron los siguientes, temperatura a 15°C con 1% de pulque como inóculo, En la gráfica a) se muestra el comportamiento del pH y °Brix durante el proceso de fermentación. Los cuales no muestran una gran variación, en la gráfica b)

se nota el comportamiento de los azúcares totales, en cuanto alcohol se obtiene un valor de 9.24 % de alcohol en el cuarto día.

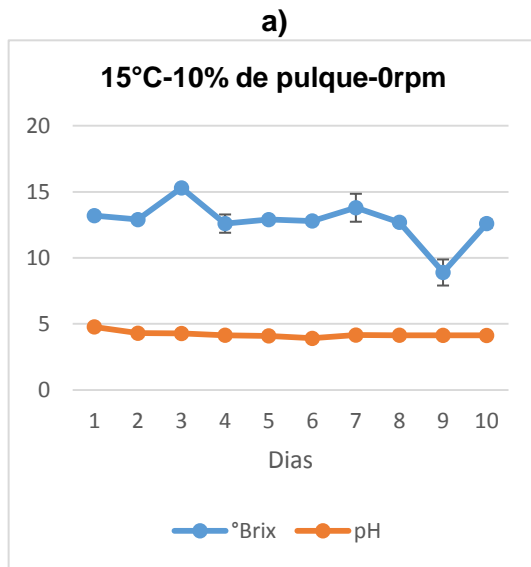


**Ilustración 1. Comportamiento del pH y °Brix.**

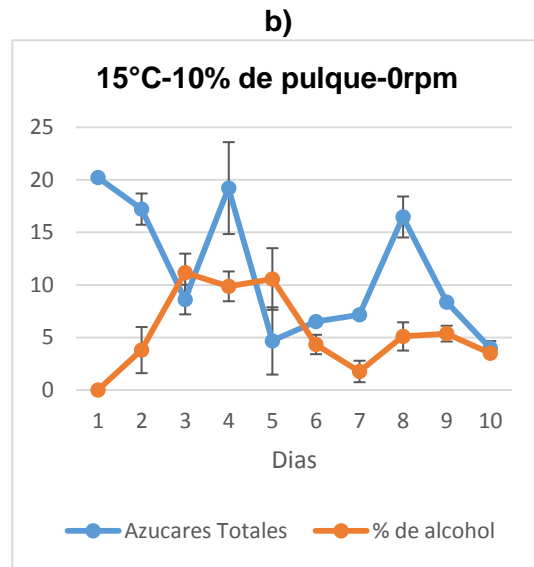


**Ilustración 2. Comportamiento del contenido de azúcares totales y producción de alcohol.**

- Los parámetros en la fermentación sin agitación fueron los siguientes, temperatura a 15°C con 10% de pulque como inóculo. En la gráfica a) los datos reflejados de pH y °Brix, se mantienen constantes sin tener cambios significativos, mientras que en la gráfica b) el alcohol llega a un valor de 11 % al tercer día mientras que los azúcares terminaron con 3.998 % de concentración en el décimo día.



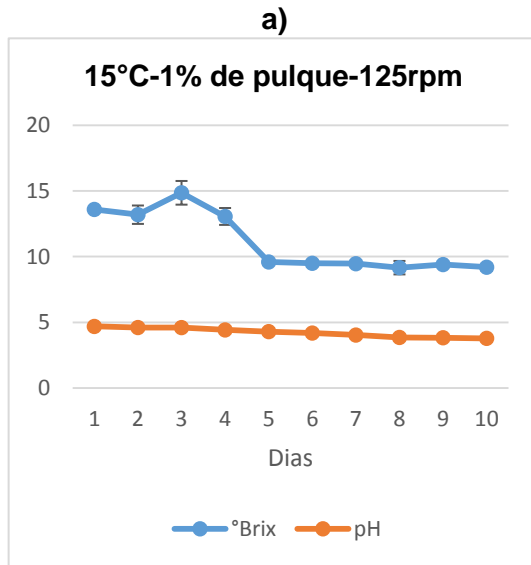
**Ilustración 3. Gráfica de pH y °Brix.**



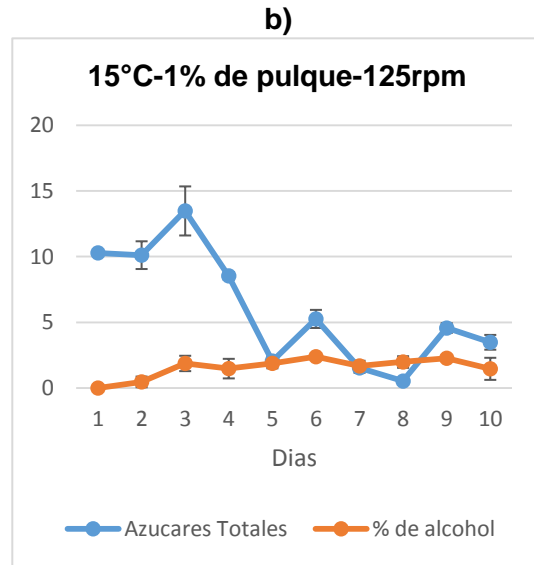
**Ilustración 4. Gráfica de azúcares totales y porcentaje de alcohol.**

#### 4.4. Evaluación de la cinética del proceso de fermentación con agitación a 125 rpm.

1. Los parámetros en la fermentación con agitación fueron los siguientes, temperatura a 15°C con 1% de pulque como inóculo con 125 rpm, cinética a) Al parecer el pH se mantiene sin cambios significativos. En el caso de los sólidos solubles al tercer día muestra un descenso significativo, grafica b) la cinética de fermentación denota que en cuanto a producción de alcohol solo se llega a tener un porcentaje apenas por encima del 2 %.

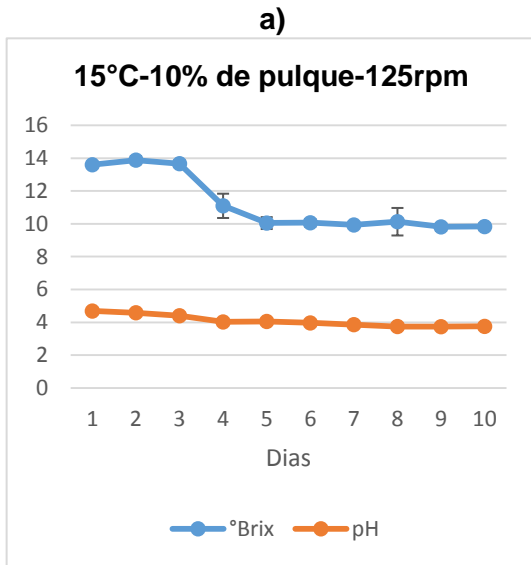


**Ilustración 5. Gráfica del comportamiento del pH y °Brix.**

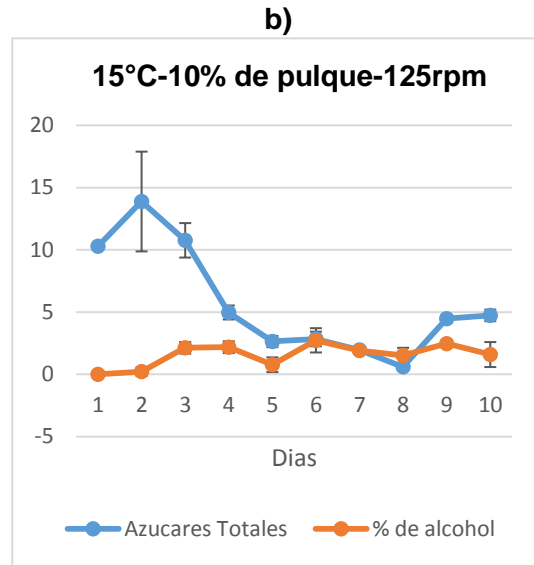


**Ilustración 6. Gráfica de azúcares totales y porcentaje de alcohol.**

- Los parámetros en la fermentación sin agitación fueron los siguientes, temperatura a 15°C con 10% de pulque como inóculo con 125 rpm. La cinética de la gráfica a) del comportamiento en cuanto a pH no tiene grandes cambios, pero los °Brix tienen un descenso a partir del tercer día. La cinética de la gráfica b) en la parte del porcentaje de alcohol apenas en su punto más alto llega a 2.77 %, en cuanto a los azúcares totales su punto más bajo es de 0.601 %.



**Ilustración 7. Comportamiento del pH y °Brix.**



**Ilustración 8 comportamiento de los azúcares totales y porcentaje de alcohol.**

#### 4.5. Tablas de análisis de varianza del proceso de fermentación.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza mostrados en la Tabla 5, demuestran que la agitación, no interfiere en la relación de °Brix durante el proceso de fermentación.

**Tabla 5 Análisis de varianza en la relación agitación y °Brix.**

Analysis of Variance for °Brix (coded units)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	6.413	6.413	3.2067	3.58	0.072
Agitacion	1	3.000	3.000	3.0000	3.35	0.100
Relacion	1	3.413	3.413	3.4133	3.81	0.083
Residual Error	9	8.053	8.053	0.8948		
Lack of Fit	1	5.880	5.880	5.8800	21.64	0.002
Pure Error	8	2.173	2.173	0.2717		
Total	11	14.467				

En el análisis de varianza de la Tabla No 6 muestra que el pH tiene una relación con la agitación esto quiere decir que la agitación afectar en los resultados del pH.

**Tabla 6 Análisis de varianza en la relación agitación y pH.**

Analysis of Variance for pH (coded units)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	0.33688	0.33688	0.16844	6.22	0.020
Agitacion	1	0.08167	0.08167	0.08167	3.02	0.116
Relacion	1	0.25521	0.25521	0.25521	9.42	<b>0.013</b>
Residual Error	9	0.24374	0.24374	0.02708		
Lack of Fit	1	0.03307	0.03307	0.03307	1.26	0.295
Pure Error	8	0.21067	0.21067	0.02633		
Total	11	0.58062				

El análisis de varianza presentado en la Tabla 7 resultado demuestra una estrecha relación en la agitación y los azúcares totales ya que hay una afectación de los azúcares por la agitación durante la fermentación.

**Tabla 7. Análisis de varianza en la relación agitación y azúcares totales.**

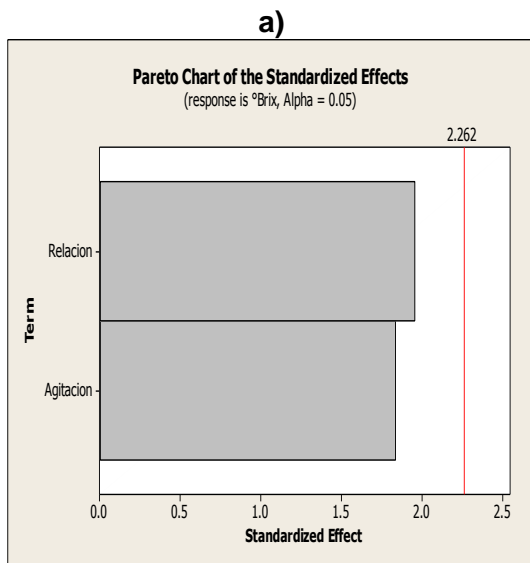
Analysis of Variance for Az totales (coded units)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	225.813	225.813	112.907	14.66	0.001
Agitacion	1	204.939	204.939	204.939	26.61	<b>0.001</b>
Relacion	1	20.874	20.874	20.874	2.71	0.134
Residual Error	9	69.318	69.318	7.702		
Lack of Fit	1	4.626	4.626	4.626	0.57	0.471
Pure Error	8	64.691	64.691	8.086		
Total	11	295.131				

De acuerdo con la Tabla 8 tal parece que el uso de la agitación afecta en la producción de alcohol durante la fermentación.

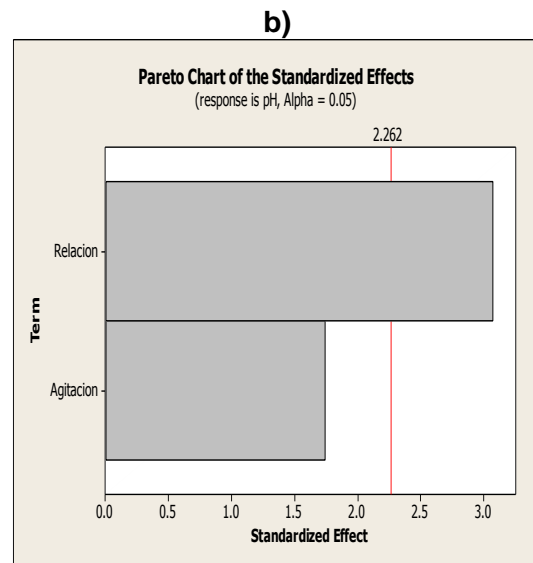
**Tabla 8. Análisis de varianza en la relación agitación y porcentaje de alcohol.**

Analysis of Variance for Alcohol (coded units)						
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effects	2	164.006	164.006	82.003	66.03	0.000
Agitacion	1	163.929	163.929	163.929	132.01	<b>0.000</b>
Relacion	1	0.077	0.077	0.077	0.06	0.809
Residual Error	9	11.176	11.176	1.242		
Lack of Fit	1	3.609	3.609	3.609	3.81	0.087
Pure Error	8	7.568	7.568	0.946		
Total	11	175.182				

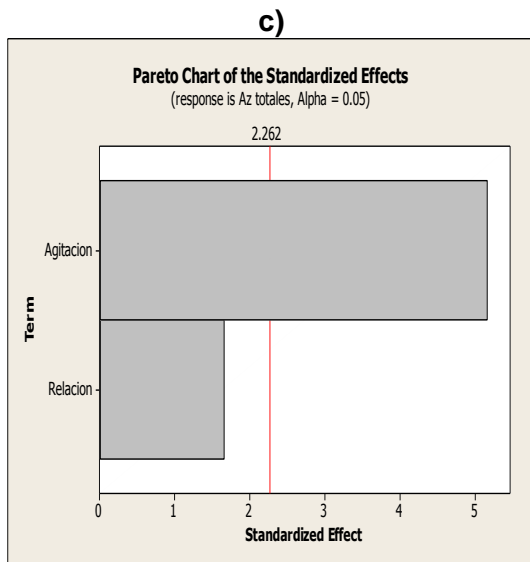
**4.6. Gráficos de Pareto sobre la relación de la agitación en diferentes factores del proceso de fermentación.**



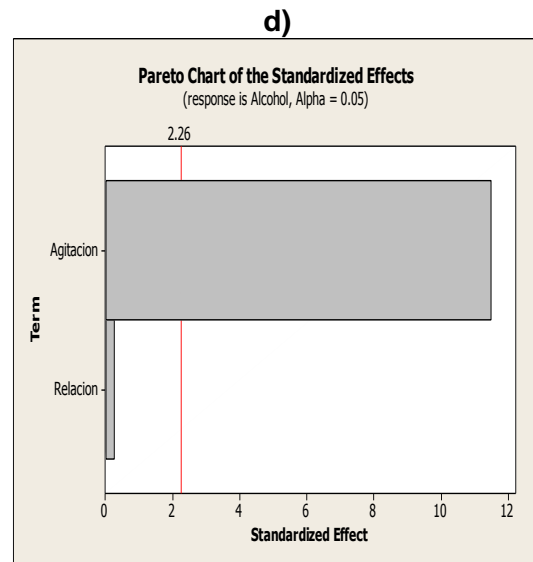
**Ilustración 9. Gráfica de relación °Brix y agitación.**



**Ilustración 10. Gráfica de relación pH y agitación.**



**Ilustración 11. Gráfica de relación azúcares totales y agitación.**

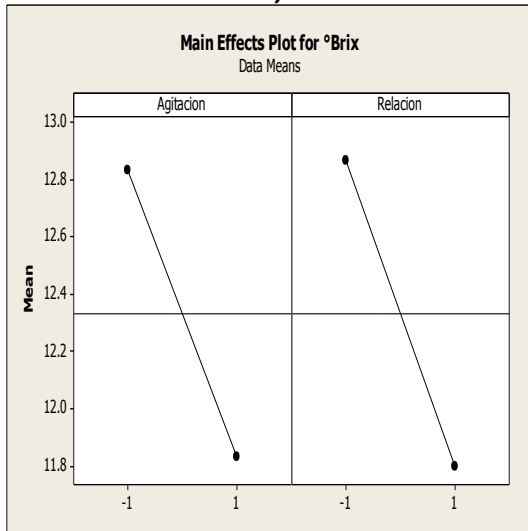


**Ilustración 12. Gráfica de relación porcentaje de alcohol y agitación.**

- a) La agitación no tiene una relación directa en la cantidad de °Brix en el proceso de fermentación.
- b) La agitación tiene relación directa en el pH durante el proceso de fermentación.
- c) La agitación durante el proceso de fermentación afecta a los azúcares totales.
- d) La cantidad de alcohol en el proceso tiene una relación con la agitación en la fermentación.

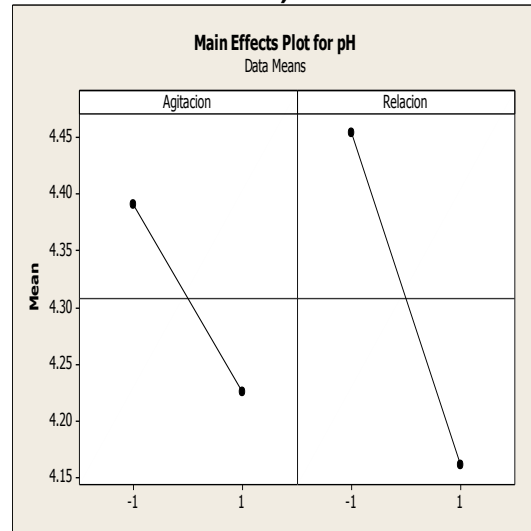
#### 4.7. Graficas de principales efectos de agitación en el proceso de fermentación.

a)



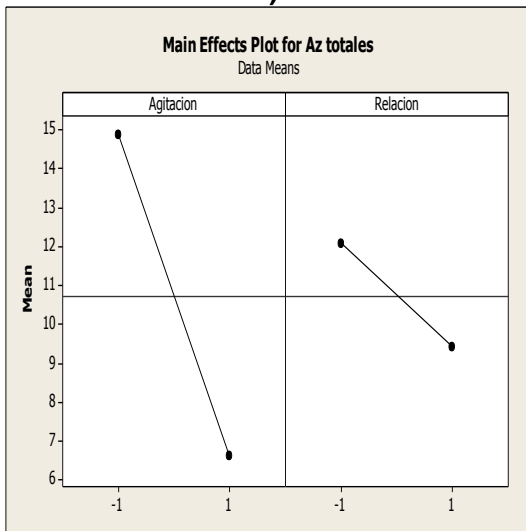
**Ilustración 13. Gráfica de principales efectos en °Brix.**

b)



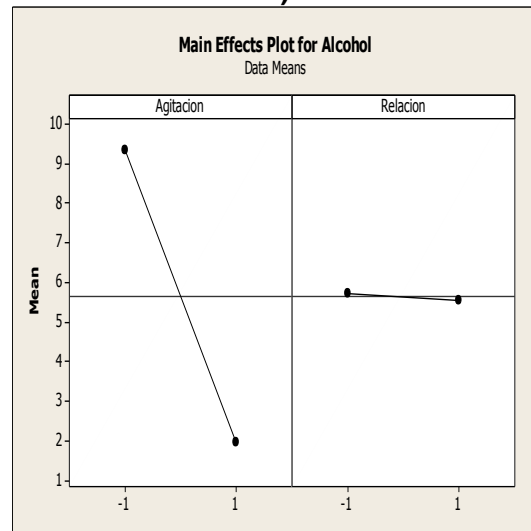
**Ilustración 14. Gráfica de principales efectos en pH.**

c)



**Ilustración 15. Gráfica de principales efectos en azúcares totales.**

d)

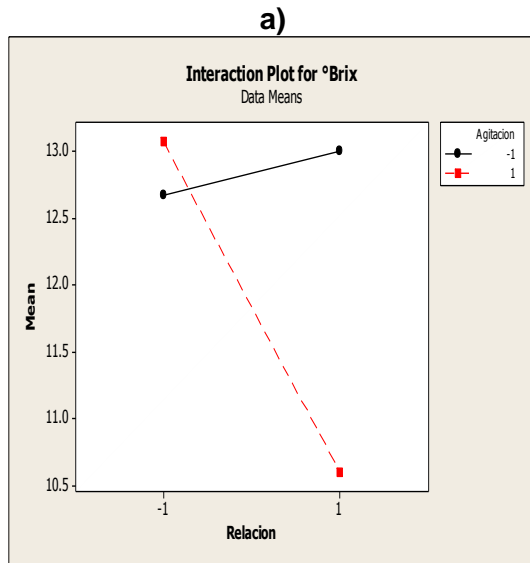


**Ilustración 16. Gráfica de principales efectos en el porcentaje de alcohol.**

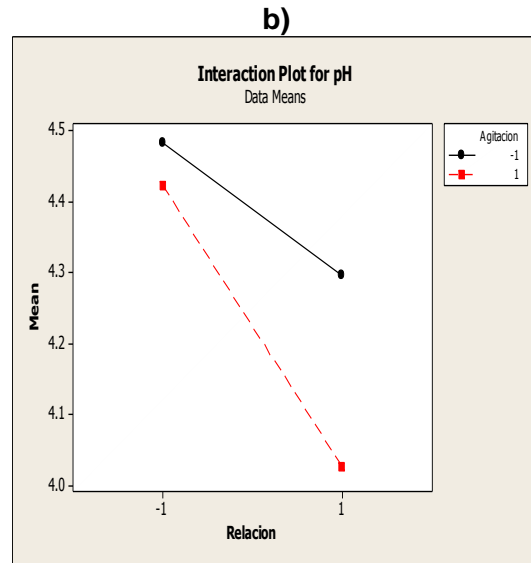
- La grafica de la relación de °Brix en cuanto a agitación demuestra que no influye de forma directa.
- La agitación no afecta en gran medida al pH pues no hay una relación estrecha a la media.
- La agitación tiene un efecto notorio en cuanto a la media de azúcares totales.
- La agitación tiene un efecto directo en la producción de alcohol en cuanto a la media.



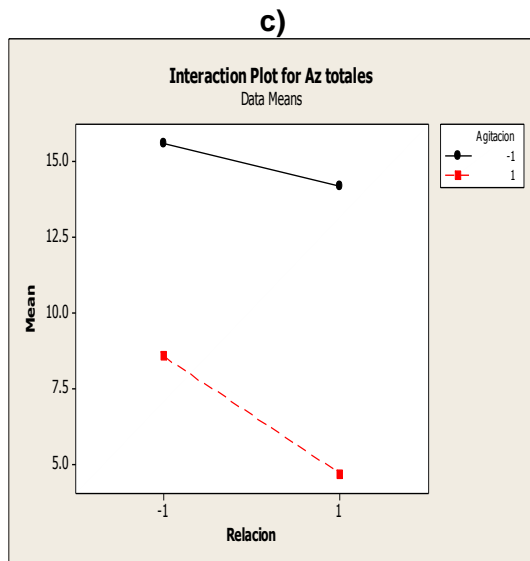
**4.8. Gráficas de interacción entre un proceso con y sin agitación en el proceso de fermentación.**



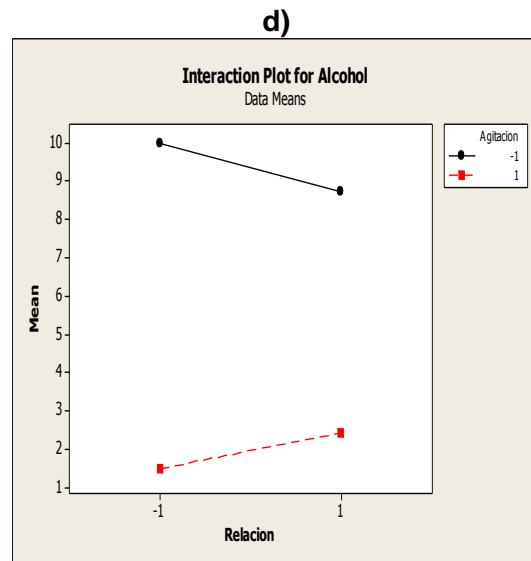
**Ilustración 17. Gráfica de interacción en °Brix**



**Ilustración 18. Gráfica de interacción en pH**



**Ilustración 19. Gráfica de interacción en azúcares totales.**



**Ilustración 20. Gráfica de interacción en porcentaje de alcohol.**

- La interacción entre un proceso de fermentación con agitación y sin ella tienen un punto de interacción.
- En cuanto a pH no hay interacción significativa entre una fermentación realizada con agitación o sin ella.
- La interacción en la cuestión del comportamiento en azúcares totales en un proceso con agitación y sin él, tiene una diferencia muy pronunciada.
- En la gráfica se demuestra la interacción en cuanto en un proceso con agitación y otro sin esta, de tal manera esto nos indica que un proceso sin agitación tiene una mayor producción de alcohol.

## Capítulo V

### Discusiones.

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NMX-V-022-1972 que nos habla sobre las características físico químicas y tipos de aguamiel y en comparación a los resultados obtenidos del análisis bromatológico se cuestionaron las siguientes características:

En cuanto al pH presente en el aguamiel es ligeramente ácido equiparado a lo que está estipulado en la Norma Mexicana, ya que las muestras evaluadas presentaban un pH de 4.77 en comparación a la literatura consultada que marca un rango de pH de 7.5 como máximo y 4.5 como mínimo, con referencia a esto se puede decir que el aguamiel se encuentra en los límites para considerarse como tal.

Los datos obtenidos en cuanto a la cantidad de sólidos solubles, se puede decir que la savia de *Agave Salmiana*, del cual obtuvimos las muestras a analizar tuvo un resultado de 11 °Brix en cual lo considera, de acuerdo a la norma como una cantidad dentro de los parámetros legales.

De acuerdo con los análisis correspondientes a porcentaje de azúcares totales y reductores, la cantidad de los azúcares totales es elevada teniendo en promedio un porcentaje del 30 % y de acuerdo a la literatura el aguamiel tiene un alto contenido de carbohidratos.

En lo que concierne a azúcares reductores el estudio realizado arrojó un resultado de 4.66 % la norma indica que el aguamiel tiene de 2 a 3 por ciento de azúcares reductores en 100 mL de aguamiel. El análisis muestra que las variaciones en las diferentes características de aguamiel pueden variar, aun siendo quizás de la misma variedad de agave.

El análisis de cenizas el aguamiel nos dio un resultado de 0.428 %, de acuerdo a la Norma Mexicana el aguamiel tiene un rango entre 0.180 y 0.430 %, se encuentra dentro del rango adecuado.

La determinación de proteína lanza un porcentaje promedio de aguamiel de 1.75 %, y la norma indica que en promedio debe de tener entre 0.1 y 0.6 % de proteína esto quiere decir que el aguamiel que usamos tiene un elevado porcentaje de proteína dentro de su composición.

El porcentaje de ácido láctico resultante del análisis fue de 0.544 %, tomando como referencia la Norma Mexicana el promedio se encuentra entre 0.8 y 0.18 %, por lo que el aguamiel tiene un contenido de ácido láctico más elevado de lo que marca la norma.

En la determinación de la densidad Ramírez y Gentry 2010 reportan una variación de 7 a 14 °Baumé. Ramírez Higuera reporta la densidad de cuatro variedades de agave, reportando en *Agave salmiana* una densidad de 1.112. La densidad en

este experimento se determinó en  $\text{g/cm}^3$  con la ayuda de un picnómetro a la temperatura de  $24\text{ }^\circ\text{C}$  teniendo como resultado  $1.034\text{ g/cm}^3$ .

Con referencia a esto se puede decir que el aguamiel que se analizó tiene una variedad de parámetros que difieren un tanto de la Norma Oficial Mexicana NMX-V-022-1972, pero también se debe considerar que las variedades de las especies y las condiciones ambientales la zona donde se extrae esta savia de agave puede afectar de manera directa las características físico químicas del aguamiel.

Sánchez -Marroquín y Esperanza 1953; Loyola-Montemayor 1956; Gonçalves de Lima 1990; García-Garibay y López Munguía 1993, ni el reglamento para el control sanitario del pulque no especifica un control de un inóculo iniciador de la fermentación. La savia del agave contiene características que la hacen un medio adecuado para la proliferación de microorganismo patógenos o dañinos para la salud, no se encontraron estudios que especifiquen la cantidad de Lactobacilos y bacterias ácido lácticas, ni estudios donde especifiquen el número de *Enterobacterias* de las cuales no se tiene documentos sobre ello.

De acuerdo con el Banco de Normas Mexicanas 2010b, Escalante y Lappe Oliveras hay tres tipos de fermentaciones en el aguamiel (alcohólica, láctica y viscosa) que han sido generalmente reconocidos como un elemento esencial de la producción de pulque, las propiedades sensoriales asociadas a los productos de los tres procesos (alcohol, ácido láctico, y viscosidad) se deben a la presencia de diferentes tipos de microorganismos durante el proceso lo cual hace que el pulque sea ácido con un pH que va desde 4.3 y 3.5, también que presente un porcentaje de alcohol que se encuentra en 4%-6% y como ya se mencionó es una bebida viscosa. Los resultados de las cinéticas de fermentación nos demostraron que un proceso de fermentación sin agitación da como resultado un grado alcohólico más elevado llegando a  $11^\circ$  de alcohol al tercer día de la fermentación, mientras que en un proceso con agitación el grado alcohólico alcanzado fue apenas por encima de  $2^\circ$  de alcohol, en cuanto a las demás condiciones evaluadas en lo que respecta al pH en la cinética de fermentación la agitación tiene un efecto en este, los rangos de pH durante la fermentación se encontraron estables dentro del que concierne a lo consultado en la Norma Mexicana y lo establecido por Escalante y Lappe Oliveras.

Los  $^\circ\text{Brix}$  no parecen estar afectados por un proceso sin agitación o con agitación, lo común en una fermentación de este tipo es que disminuyan paulatinamente los sólidos solubles conforme pasa el tiempo por la actividad microbiana. Los productores de Pulque de la Hacienda de Amoltepec, Zacatlan Puebla nos indicaron que el pulque llega a tener  $5\text{ }^\circ\text{Brix}$ .

Las condiciones usadas durante el proceso de fermentación, fueron las siguientes, un espacio con poca luz y con temperatura templada por eso se eligió que fuera a  $15\text{ }^\circ\text{C}$ , esto se hizo tomando en cuenta las condiciones en las que trabajan los productores de pulque en Puebla.

## **Capítulo VI**

### **Conclusiones.**

El análisis bromatológico permitió considerar al pulque procesado, dentro de un producto apto para la ingesta humana, basado en las Normas Oficiales Mexicanas se establece que el tipo de pulque es del tipo dos menores por las características presentadas.

El proceso de pasteurización hace que el aguamiel pierda el olor herbáceo característico de la bebida y que lo hace ser considerado de baja aceptación por consumidor.

Los datos de la cinética de los diferentes procesos de fermentación, muestran que la agitación afecta la producción de alcohol y la degradación de los azúcares totales ya que estos últimos, disminuyen de forma rápida pero no hay una producción de alcohol elevada.

El método más adecuado para la producción de alcohol es una fermentación sin agitación y el porcentaje de inóculo agregado no es un factor determinante en la producción de alcohol ya sean 1% o 10% con base al volumen de aguamiel.

## Capítulo VII

### Bibliografía.

Badui Dergal S. Química de los alimentos. México, 2006, Cuarta edición, Reacciones de oscurecimiento o pardeamiento, pag. 59-69.

Banco de Normas Mexicanas., (-) NMX-022-1972., AGUAMIEL. HYDROMEL. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

Banco de Normas Mexicanas., (-) NMX-F-420-1982., productos alimenticios para uso humano, determinación de acidez en leche fluida. food products for human use-determination of acidity in fluid milk. normas mexicanas. dirección general de normas.

Barry, V., McCleary., Murphy. (1999) Measurement of Total Fructan in Foods by Enzymatic/ Spectrophotometric Method: Collaborative Study. Food Composition and Additives. 356-364.

Bayona, M., Ardua, M., Castellanos, O., & Solís, M. B. R. (2002). Determinación de bacterias contaminantes en el proceso de producción de alcohol etílico y su relación con la floculación de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 64-71.

Cazorla, J. G., Vayreda, M. X., & Romero, R. A. (2005). *Técnicas usuales de análisis en enología*. Panreac Química.

Cervantes, M. (2008) Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. Sociedad Mexicana de Ciencia de Superficies y Materiales. 1-5.

Erlwein, S., Tapia, J. R. M., & Pegueros, A. V. Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y concepción social en Apan, Hidalgo.

Escalante A., Giles-Gómez M., Flores G. (2012) Pulque Fermentation. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology., Capítulo 43, pag.691-706.

Escalante, A., Giles M., Hernández G., (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 126-134.

Figuroa Moncayo, M. A., & Sosa Sosa, E. A. (2015). Caracterización microbiológica de la savia de Agave americana (cabuya negra) de ecotipos de las provincias de Pichincha y Cotopaxi.

Flores, A., Mora, R., Romero, L., (-) Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

León, D., Méndez, D. S. (2012) Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. Facultad de Ciencia y Tecnología, 115-122.

Loyola-Montemayor E. (1995). La industria del puque. México, D.F. Departamento de investigación industriales. Banco de México SA. Pag. 348.

Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4),

Montes, M. J. V. (2014). “Pulque limpio”/“pulque sucio”: disputas en torno a la legitimidad y la producción social del valor. *Revista Colombiana de Antropología*, 50(2), 41-63.

Puértolas, E., Álvarez, I., Raso, J. (2012) Aplicación industrial de los pulsos eléctricos de alto voltaje para la pasteurización de alimentos: revisión de su viabilidad técnica y comercial. CTyA. 81-88.

Quintanar Duarte Enrique. Física principios con aplicaciones. Densidad. Sexta edición, 2006.

RAMIREZ HIGUERA, A. B. R. I. L. (2012). evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en Lactobacilos *Delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus*.

RAMOS ZABLAH, C. L. A. U. D. I. A. (2015). Métodos de conservación para retardar la fermentación en aguamiel.

### **Páginas web.**

<http://www.mexicodesconocido.com.mx/el-pulque-la-bebida-de-los-dioses-hidalgo.html>

<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-037-1972.PDF>

<http://viaorganica.org/elaboracion-de-pulque/>

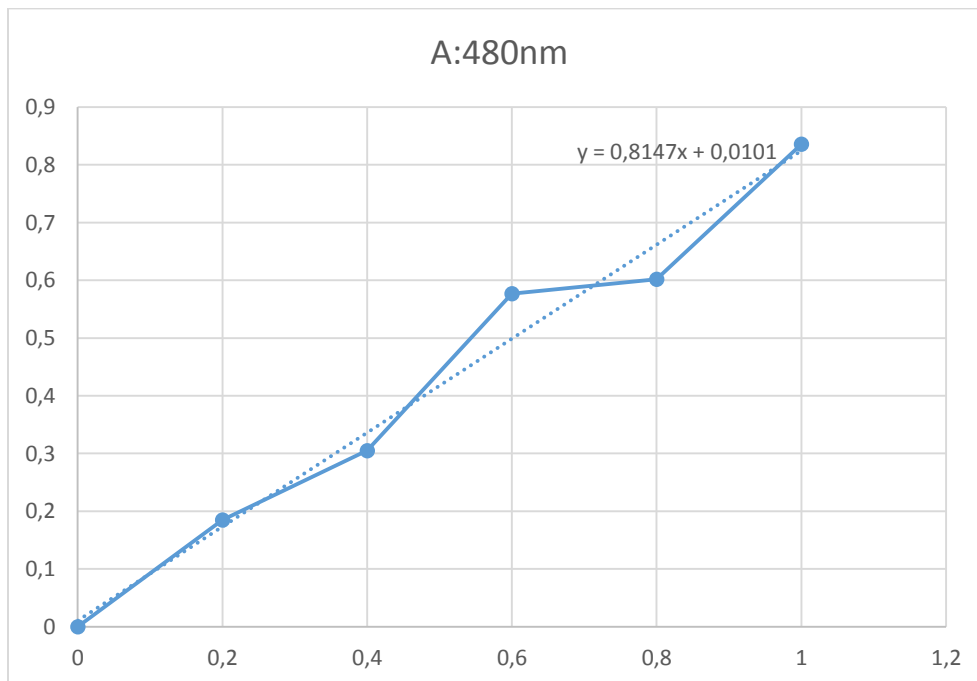
## Anexos.

Formato para la curva de calibración de azúcares totales.

Solución estándar de sacarosa 0.01/10ml=0.1%					
#	ml solución estándar	ml agua destilada	ml Fenol-sulfúrico	Agua destilada	A:480nm
1	0	1	2	2	
2	0.2	0.8	2	2	
3	0.4	0.6	2	2	
4	0.6	0.4	2	2	
5	0.8	0.2	2	2	
6	1	0	2	2	

Nota: por el alto contenido de azúcares en el aguamiel tuviese un color más oscuro así que se diluyo un 1 mL en 100 mL de agua destilada se tiene que hacer Al tener los seis tubos de ensaye con las diluciones, se colocaron en baño de hielo. Agregando lentamente y por la pared de los tubos 2 mL de solución fenol-sulfúrico. Posteriormente se cambiaron a un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Los tubos se atemperaron, se vaciaron las mezclas en celdillas y se leyeron las absorbancias dentro del espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, GENESYS YS 10 UV) de cada una de las diluciones a 480 nm.

### Anexo curva estándar de azúcares totales



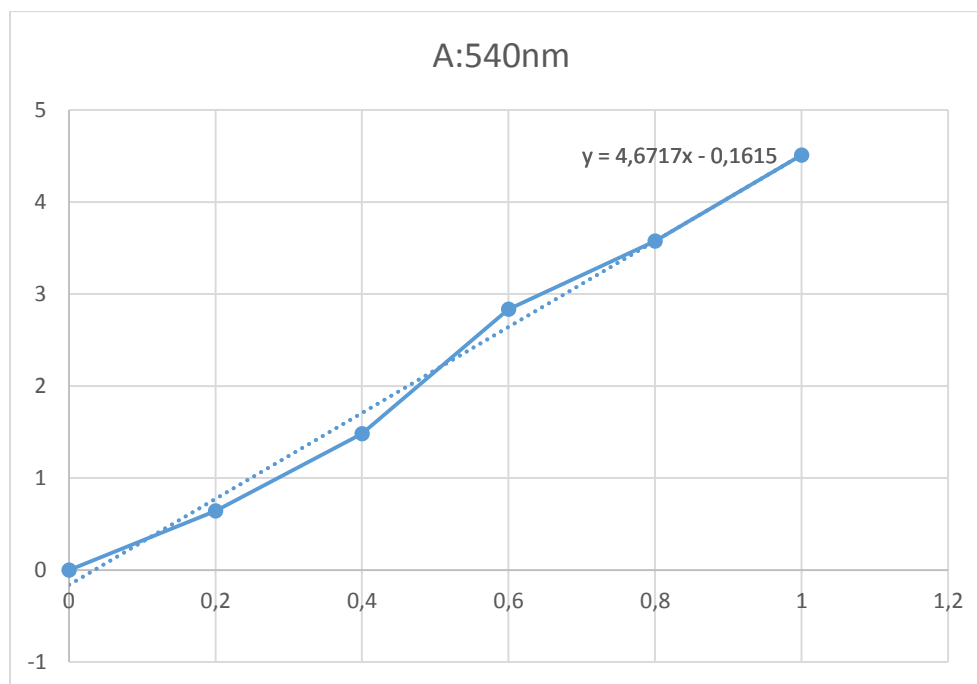
### Formato para la curva de calibración de azúcares reductores.

Solución estándar de fructuosa 0.01/10ml=0.1%				
#	ml de estándar	ml de agua destilada.	ml Solución DNS	A:540nm
1	0	1	1	
2	0.2	0.8	1	
3	0.4	0.6	1	
4	0.6	0.4	1	
5	0.8	0.2	1	
6	1	0	1	

Nota: por el alto contenido de azúcares en el aguamiel tuviese un color más oscuro así que se diluyo un 1 mL en 100 mL de agua destilada. Siempre que se añade una sustancia a otra se realizó la respectiva agitación.

Después de agregar el DNS y antes de agregar los 5 ml de agua destilada, los tubos se sometían a baño de agua hirviendo por 5 minutos después de esto se pasan a enfriar en baño de hielo para proseguir a leer en el espectrofotómetro a 540 nm.

### Anexo curva estándar de azúcares reductores

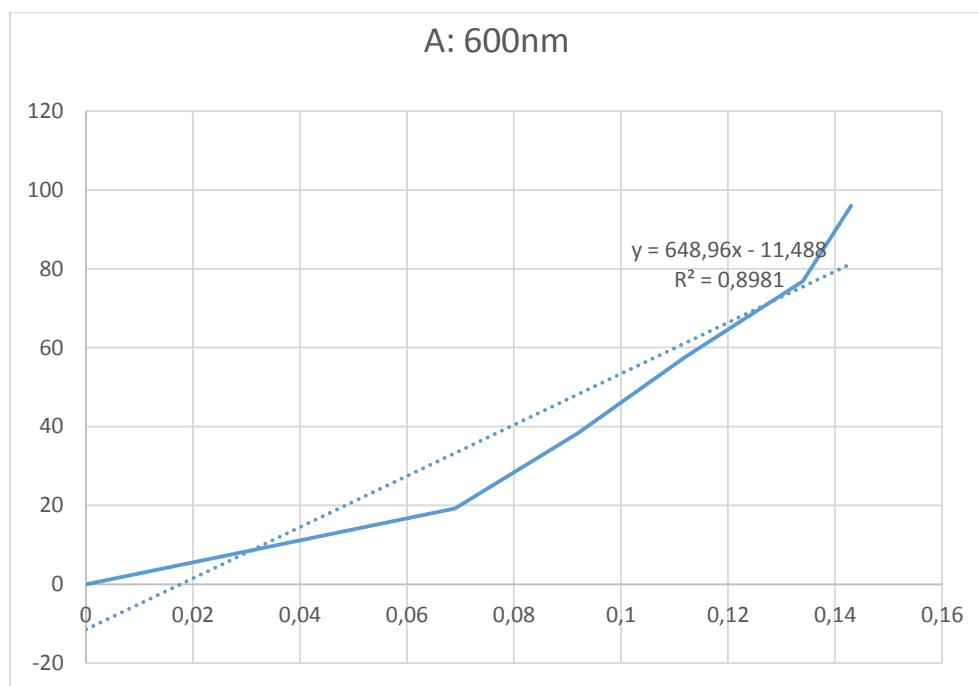




### Formato para la curva de calibración para determinación de alcohol.

#	mL alcohol etílico	mL de agua destilada	A:600nm
1	0	1	
2	0.2	0.8	
3	0.4	0.6	
4	0.6	0.4	
5	0.8	0.2	
6	1	0	

### Anexo curva estándar de alcohol.



**Secuencia de imágenes del proceso de investigación.**

**a)**



**b)**



**c)**



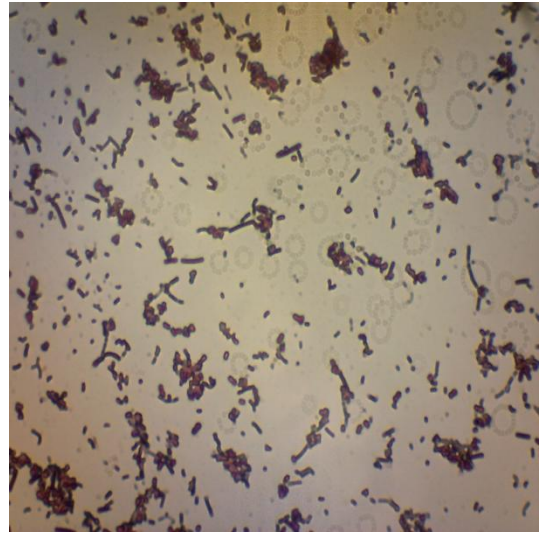
**d)**



e)



f)



g)



h)



i)



j)



- a) Planta de *Agave salmiana*.
- b) Preparación del agave para extracción de aguamiel.
- c) Determinación de alcohol.
- d) Pasteurización del aguamiel, para inocular.
- e) Análisis microbiológico.
- f) Observación de microorganismo con tinción de Gram.
- g) Extracción de grasa por el método Soxhlet.
- h) Determinación de proteína por el método MicroKjeldhal.
- i) Elaboración de pulque en Puebla.
- j) Aguamiel fermentado.