UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Efecto del tiempo de almacenamiento y de la pasteurización flash en las propiedades fisicoquímicas y probióticas de pulque producido en Jiquipilco, Edo. de México.

Por:

Ismael Cavazos Durón

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

AGOSTO, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

PROGRAMA DOCENTE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto del tiempo de almacenamiento y de la pasteurización flash en las propiedades fisicoquímicas y probióticas de pulque producido en Jiquipilco, Edo. de México.

Por:

Ismael Cavazos Durón

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobado por el comité de asesoría:

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón	Dr. Alberto Antonio Neira Vielma
Asesor principal	Asesor Principal Externo
M.C. Carlos Alberto García Agustince	Q.F.B. María del Carmen Juilia García
Co-asesor	Co-asesor

Saltillo, Coahuila — Agosto, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

PROGRAMA DOCENTE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto del tiempo de almacenamiento y de la pasteurización flash en las propiedades fisicoquímicas y probióticas de pulque producido en Jiquipilco, Edo. de México.

Por:

Ismael Cavazos Durón

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el jurado examinador:

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Presidente

Dr. Alberto Antonio Neira Vielma
Vocal Suplente

M.C. Carlos Alberto García Agustince
Vocal

Q.F.B. María del Carmen Juilia García
Vocal

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coah. Agosto, 2026

Agradecimientos

Ing. Valeria Cavazos: Valeria infinitas gracias por brindarme de tu apoyo de manera autentica y de completamente de corazón. Enseñándome verdadero amor de hermanos y también por estar dispuesta a ayudarme en cualquier momento y en cualquier situación sin importar lo adversa u obscura que se pueda tornar la penumbra sé que siempre serás un faro de luz con el que puedo cotar para alumbrar el camino. Y hago énfasis en que no solamente en situaciones de carácter escolar sin en el área profesional, estudiantil y sobre todo personal.

Ximena: quiero agradecer de la manera más humilde que me permite mi ser a Ximena Hernández por su apoyo y constancia durante la elaboración de este proyecto. Siendo parte fundamental y determínate en múltiples áreas y procesos de este trabajo. Pero también quiero agradecer el incondicional apoyo moral y que de manera autentica se convirtiera en una bocanada de aire en los momentos en los que alcanzar la cúspide de este trabajo se veían más complicados o incluso imposibles.

Tía Carmen julia: pocas veces se me ha mostrado un lado tan humano y tan paciente respecto a mi falta de habilidades, técnicas y conocimientos, sin embargo, de manera inherente se me mostro como aprender y mejorar en todas estas áreas en las que no contaba con la experiencia adecuada, de manera cariñosa y honesta, siempre en busca de dar la mejor versión de mí mismo, por eso y por el apoyo incondicional solamente me resta decir GRACIAS.

José Cavazos Aguirre: muchas gracias por ser de las primeras personas que confiaron en mi cuando seleccione esta carrera. Se que el apoyo que se me brindo en los últimos años siempre fue de manera autentica y pura, por eso y por confiar, creer y apoyarme desde el comienzo hasta el final estaré siempre agradecido.

Dra. Sonia: si tuviera que agradecer algo sin duda sería el que compartiera de manera magistral sus conocimientos para apoyarme a la elaboración de este proyecto, pero sobre todo la gigantesca capacidad de tolerancia que mostró con mis numerosas fallas con respecto a la hora de hacer la tesis e incluso el que de manera accidental paridera gran parte del primer borrador. Pero incluso tomando en cuenta todas esas fallas garrafales, bajo ningún momento perdió la serenidad ni la calma, dándome una un par de las lecciones más valiosas en mi carrera y de vida. La primera es que sin importar que tan mal sea la situación siempre se puede hacer algo para remediarlo y la segunda, siempre se debe contar múltiples respaldos de cualquier documento o proyecto de relevancia. Muchas gracias.

Ing. Marisol Sánchez Molina e Ing. José Adolfo Morales: pensar en ustedes siempre tiene como resultado tener una combinación de recuerdos que rayan en lo enternecedor y lo estresante de proyectos pesados, con fecha limite respirando en la nuca. Pero sin duda alguna si tuviera que agradecer algo a ustedes seria que me mostraran la hermosa evolución de como un trio de personajes con una montaña de situaciones y momentos de dificultad critica, pueden encontrar luz en la camarería y compañerismo para que tener como resultado una de las relaciones de amistad mas bellas que he tenido en mi vida. Gracias por estar siempre, este proyecto jamás hubiera llegado tan lejos sin su presencia.

Ing. Jairo Fabián Duran e Ing. Karla jurado Badillo: resulta complicado imaginar que desde el día uno el par de individuos con los que me topé en los cursos de inducción se convertirían mis compañeros de batallas en las aulas, y de viajes, las enseñas y conocimientos que obtuve de ustedes no se limita únicamente a cuestiones escolares ni profesionales, tuve la fortuna de aprender de ustedes el valor del apoyo honesto y la retroalimentación en el crecimiento personal. Pero si hay que quisiera agradecerles es que por ser mis compañeros y amigos. Gracias por ser uno de los engranajes más importantes de toda mi carrera y gracias por dejarme llamarlos amigos.

Lic. Edith de la cruz, Lic. Gabriel Celis e Ing. Gabriel Eugenio Varela: considero que resulta de una dificultad muy elevada poder cuantificar el nivel de

agradecimiento que se pude llegar a tener por un grupo de personas respecto a un trabajo como este. Mas tomando en cuenta que no pertenecen a la universidad, pero lo que si se es que no todas las lecciones se llevan en el salón de clases. Podría decir muchas cosas, pero solo diré que mi nivel de agradecimiento dirigido para ustedes es proporcional a la cantidad de veces que se burlaron de mi por mi dislexia y las veces que me presionaron para terminar este proyecto junto el sin fin de ocasiones que los llame “hermanos” y se rieron y eso ya es decir mucho.

MVZ. Daniel Gonzales y MVZ. Andrea Oviedo: en ocasiones uno suele iniciar un proyecto o una conversación sin saber absolutamente nada de lo que puede llegar a pasar, en un gran porcentaje de estas situaciones, terminaras llegando a un punto de autorreflexión donde te preguntaras si haber hablado con esa persona o embárcate en ese proyecto fue lo más adecuado. Pero de manera inversa al porcentaje anteriormente mencionado, existe la mínima posibilidad de que te topes con individuos que, definidos en una sola palabra, pueden definirse como extraordinarios, gente que te brindará el todo su apoyo de manera incondicional y pura, podría escribir cientos de párrafos sobre Andrea Oviedo y Daniel Gonzales, pero solo diré que les agradezco todos los consejos y abrirme un espacio en su vida desde el inicio. Pero sobre todo por dejarme ser su amigo.

Elizabeth García y Enrique rubio:

Dedicatoria

Dedicatoria Norma Leticia Durón Escareño e Ismael Cavazos Aguirre

La dedicatoria de trabajos de esta índole siempre comienza con un “este trabajo está dedicado a …” pero en esta ocasión quisiera comenzar de una manera diferente, dado que esto está dedicado a personas especiales. Mi mamá y mi papá. El agradecer es una práctica tan común hoy en día que con dificultad se puede vislumbrar de lo que se dice de manera automática y de manera genuina. Hoy lo hare de la manera más autentica que me permite mi ser. No únicamente la dedicatoria de este trabajo es para mis padres, quiero dedicarles todo lo bueno que he hecho y haré en mi vida, dado que, sin lugar a duda, son y serán el ejemplo más ferviente e incorruptible de amor sincero que he visto en mi vida. Todo lo que soy y lo que seré será un reflejo del amor incondicional del que me brindaron sin pedir nada a cambio y siendo este uno de los primeros peldaños del camino que me espera. Quiero dedicar esta tesis a Norma Leticia Durón. El ejemplo viviente de la mujer inquebrantable e incasable que da amor a brazos abiertos y de quien he aprendido que todas las cosas tienen un valor y que la vida es un cumulo de decisiones tomadas y por tomar que se compone de momentos, y que siempre hay que disfrutar la vida en todas su facetas, llorar cuando se tenga que llorar, el dolor es parte vivir, reír cuando se está feliz, nunca se sabe cunado volverás a reír a carcajadas, por eso y por todas las partes de mi persona que me hacen lo que soy, infinitas gracias mamá. Y también quiero dedicar a mi papá Ismael Cavazos Aguirre. Mi campeón quien tristemente no podrá leer esto pero si fue y será parte fundamental de este proyecto y de todos mis éxitos obtenidos y los que faltan por obtener está dedicada al hombre que me enseño el valor del trabajo y la humildad, es el uno de los engranajes de mi ser que fungen como motor para mejorar cada día de mi vida y prometo que este será uno de los primeros logros que lo harán sentir orgullos hasta el cielo. Por eso y ser lo mejor que me ha dado la vida gracias a ambos los amo y siempre los amare. Y que esta hoja de dedicatoria sea testigo con dios de que siempre los amaré y siempre les agradeceré ser lo mejor de mi vida. Los amo.

Índice General

Resumen 1
Abstract 1
1. Introducción 2
2. Antecedentes 4
2.1. El pulque 4
2.2. Fermentación 5
2.2.1. Fermentación ácida 6
2.2.2. Fermentación viscosa 6
2.2.3. Fermentación alcohólica 6
2.2.4. Fermentación acética 7
2.3. Métodos de conservación del pulque 7
2.4. Métodos de conservación emergentes del pulque 8
2.4.1. Tipos de pasteurización 9
2.5. El Pulque como Alimento Funcional y Probiótico 11
3. Objetivos: 13
3.1. Objetivo general 13
3.2. Objetivos Específicos 13
4. Hipótesis: 14
5. Metodología 15
5.1. Recolección de muestras 15
5.2. Pasteurización Flash de las muestras de pulque 16
5.3. Análisis fisicoquímico del pulque 16
5.3.1. Determinación de pH 17
5.3.2. Determinación del porcentaje de acidez 17
5.3.3. Determinación de grados de alcohol 17
5.3.4. Determinación de grados Brix 17
5.3.5. Determinación de color 17
5.4. Determinación de proteínas solubles 18
Preparación del reactivo proteína soluble 18
6. Resultados y Discusión 20

6.1. Determinación del pH 21
6.2. Contenido de alcohol 23
6.3. Grados Brix 24
6.4. Contenido de ácido láctico 25
6.5. Azúcares reductores 26
6.6. Determinación del color 28
6.7. Análisis microscópico del pulque fresco 29
6.8. Contenido de probióticos 31
7. Conclusión 34
8. Referencias bibliográficas 35

Índice de tablas

Tabla 1 . parámetros fisicoquímicos de las muestras de pulque antes y después de pasteurización flash. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Tabla 2 análisis de colorimetría de muestras de pulque antes y después de pasteurización flash. 29
Tabla 3 . tabla de microrganismos de probióticos en pulque pasteurizado y sin pasteurizar. ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Índice de figuras

Figura 1. Pulque como bebida tradicional 4
Figura 2. Raspado del hueso del Agave salmiana para obtener el aguamiel 5
Figura 3. Fermentación del aguamiel para obtener el pulque 5
Figura 4. Evolución del pH del pulque después de la pasteurización flash durante un tiempo de almacenamiento de 1 y 4 meses. 23
Figura 5. Evolución dé % de alcohol en el pulque 24
Figura 6. Evolución de % Brix en muestras tras la pasteurizacion flash 25
Figura 7. % de ácido láctico del pulque en almacenamiento 1 y 4 meses después de la pasteurización flash 26
Figura 8. Evolución de azucares reductores luego de la pasteurización flash. 28
Figura 9. Muestras de pulque durante el proceso de colorimetría 29
Figura 10. Microorganismos identificados presuntivamente mediante observación microscópica en una muestra de pulque fresco. a) *Saccharomyces cerevisiae*, b) *Leuconostoc mesenteroides* y c) *Lactobacillus* spp 31
Figura 11. Contenido de probióticos en el pulque antes y después del tratamiento térmico en almacenamiento por 1 y 4 meses 33

Resumen

El presente estudio evalúa el impacto de la pasteurización flash en las propiedades fisicoquímicas y probióticas del pulque artesanal con el objetivo de extender su vida de anaquel sin comprometer sus características organolépticas y funcionales. Se analizaron muestras sometidas a tres tiempos de pasteurización (15, 30 y 60 segundos a 80°C) y se compararon con un control sin pasteurizar, evaluando su evolución en periodos de 30 y 120 días de almacenamiento. Los resultados indican que la pasteurización estabiliza el pH, reduce la actividad microbiana y mantiene la concentración de azúcares fermentables, favoreciendo la conservación del producto. Sin embargo, la viabilidad de los probióticos se ve afectada en tratamientos prolongados, sugiriendo que la pasteurización a 30 segundos ofrece el mejor equilibrio entre estabilidad y funcionalidad. Estos hallazgos resaltan la importancia de optimizar los métodos de conservación del pulque para su comercialización a gran escala sin perder su valor tradicional y nutricional.

Abstract

This study evaluates the impact of flash pasteurization on the physicochemical and microbiological properties of artisanal pulque, aiming to extend its shelf life without compromising its organoleptic and functional characteristics. Samples subjected to three pasteurization times (15, 30, and 60 seconds at 80°C) were analyzed and compared with an unpasteurized control, assessing their evolution over 30- and 120-days storage periods. The results indicate that pasteurization stabilizes pH, reduces microbial activity, and maintains fermentable sugar concentrations, favoring product preservation. However, probiotic viability is affected in prolonged treatments, suggesting that pasteurization for 30 seconds provides the best balance between stability and functionality. These findings

highlight the importance of optimizing pulque preservation methods for large-scale commercialization while maintaining its traditional and nutritional value.

1. Introducción

El agave pulquero es una planta con 300 especies y 9 géneros de las cuales la mayoría pueden aún están presentes en México. Incluyendo al *Agave salmiana* como uno de los principales agaves pulqueros, dicha planta puede reproducirse con mayor facilidad estados de la república mexicana como Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y CDMX. Al ser una planta tan emblemática de México es común que exista una cantidad significativa de usos y productos derivados de esta, aunque indiscutiblemente entre la gran brecha de opciones de productos derivados que el agave pulquero oferta, existe uno que destaca sobre los demás, no únicamente porque tiene importancia histórica, sino que tiene su inicio incluso antes de la época prehispánica en México, “el pulque”. (Figueredo et al.,2024)

Sin mencionar que a la par de su gran valor histórico, resulta ser una bebida de alto nivel nutrimental. Al ser una fuente de aminoácidos y proteínas, resulta ser una bebida de alta carga de probióticos lo que favorece en gran medida el microbiota intestinal de quien la consume. (Becker et al., 2024)

El pulque es una bebida fermentada que dependiendo de su elaboración puede otorgar sabores que pueden ir desde los frutos rojos, pasando por toques más frutales que se pueden reconocer con muchas semejanza al vino tinto y en algunas ocasiones a mazapán, todas estas propiedades aromáticas y degustativas son consecuencia directa de sus múltiples procesos de fermentación y adición de complementos culinarios durante su elaboración, “las propiedades finales sensoriales del pulque están definidas por el desarrollo simultáneo de 4 tipos de fermentaciones” (fermentación ácida, fermentación alcohólica, síntesis de exopolisacáridos (EPS) y fermentación acética) dicha bebida al igual que las tradiciones se niega a desaparecer teniendo su época dorada durante la década de los cuarenta donde llegaba a duplicar la cantidad

de producción anual por encima de otras bebidas fermentadas en México. Sin embargo, por una gran cantidad de difamaciones, dicha cifras se vieron invertidas en un lapso de diez años. Teniendo como consecuencia una disminución significativa tanto en la producción como en el consumo a nivel nacional. Dichas secuelas se han visto reflejadas hasta la fecha están desprestigiados y son motivo de menosprecio social, como lo eran desde mediados del siglo pasado. Aunado a lo anterior, el abandono del cultivo del maguey pulquero en la zona central de México ha supuesto una importante disminución en la producción de pulque. Por esta razón se han creado diversas asociaciones de productores que buscan promover el consumo de esta bebida tradicional con el fin de impulsar la economía de estas regiones agrícolas. Estas asociaciones de productores no solamente pretenden impulsar el pulque a nivel local sino también se pretende incursionar en el mercado global principalmente en E.U.A. y Europa. Sin embargo, no se cuentan con tecnologías establecidas para alargar la vida de anaquel del pulque, por lo cual este proyecto pretende establecer las mejores condiciones de pasteurización y adición de conservadores naturales que permitan alargar su vida útil. (Cervantes-Elizarraras et al., 2017)

Hoy en día, aunque la producción anual de pulque no es lo que llego a ser durante su época dorada hay una luz al final del túnel donde las proyecciones de producción y consumos del pulque como bebida se ven en incremento desde el año 2021 teniendo un 10% de aumento en dichos parámetros anteriormente mencionados. (SIAP, 2024)."

2. Antecedentes

2.1. El pulque

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana producida a partir de la fermentación de la savia fresca (aguamiel) extraída de diversas especies de agave (Figura 1). Esta bebida presenta una mayor prevalencia de consumo y producción en las zonas del centro de México, manteniendo un impacto significativo en sectores rurales (Escalante et al., 2016). Físicamente, el pulque se caracteriza por una apariencia blanquecina, una textura viscosa y un perfil sensorial con notas ácidas, con un contenido alcohólico que oscila entre los 4 y 7° (Castro-Rodríguez et al., 2023). El proceso de producción y calidad del producto final puede analizarse a través de cuatro vertientes fundamentales.



FIGURA 1. PULQUE COMO BEBIDA TRADICIONAL

Fuente: Foto extraída de internet

Este proceso consiste en retirar el pedúnculo de la planta madura con un objeto puntiagudo, dejando un hoyo en la parte central de la planta, mejor conocido como cajete, una vez cubierto con rocas u hojas del mismo maguey. Posteriormente, se **raspan las paredes de la cavidad** (Figura 2) para estimular la producción y favorecer que continúe fluyendo el aguamiel. El raspado se realiza periódicamente durante el periodo productivo de la planta.



FIGURA 2. RASPADO DEL HUESO DEL AGAVE SALMIANA PARA OBTENER EL AGUAMIEL

Fuente: Foto extraída de internet

2.2. Fermentación

Después del raspado de hueso, el aguamiel se pasa a barriles en donde se lleva a cabo el proceso de fermentación. El aguamiel, pasa por múltiples procesos fermentativos dentro de los cuales podemos encontrar fermentación ácida, fermentación alcohólica, fermentación viscosa y también fermentación acética. (Swings & De Ley, 1977; Castro-Rodríguez et al., 2023).



FIGURA 3. FERMENTACIÓN DEL AGUAMIEL PARA OBTENER EL PULQUE

2.2.1. Fermentación ácida

La fermentación ácida es de gran importancia para la obtención de la textura y sabores tan característicos del pulque, pero su importancia no se limita únicamente a aspectos sensoriales de la bebida. La fermentación ácida se coloca como piedra angular dentro del proceso de elaboración del pulque, ya que el desempeño de esta fermentación resulta crucial para determinar el nivel de pH de la bebida siendo que el parámetro ideal del pulque entre 4 y 7. Siendo este el rango óptimo para la preservación y reproducción de microrganismos benéficos (probióticos y levaduras) para el microbiota intestinal, al mismo tiempo que dificulta la reproducción de agentes patógenos en el pulque. (Ruiz-Ramírez et al., 2023).

2.2.2. Fermentación viscosa

La síntesis EPS, conocida como fermentación viscosa, produce macromoléculas de carbohidratos, usualmente con proteínas, mediante enzimas bacterianas. Mayoritariamente de *leuconstoc* incluyendo *l.mesenteroides y l.kimch´*. dando como resultado la producción de exopolisácaridos de dextrano y fructano, tomando como punto de arranque la sacarosa y teniendo interacción con enzimas como glucosin y fructosil transfernasa. Dicho proceso dota al pulque de sus propiedades viscosas. (Cervantes-Elizarraras et al., 2017)

2.2.3. Fermentación alcohólica

Es un proceso fundamental en durante la elaboración de bebidas fermentadas es realizado principalmente por levadura "*S.ceveriase*" y en menor medida por la "a-*proteobacteriana z mobilis*" ambos organismos teniendo como principio convertir los azúcares fermentables del aguamiel en etanol y CO_2 mediante la ruta metabólica (enter-doudrofF). Dicho proceso en el caso del pulque se puede realizar durante intervalos que van de 4 horas a 8 horas y en algunos casos hasta 48 horas. Dependiendo de la cantidad y calidad del aguamiel. Siendo el caso del pulque que la temperatura promedio de la fermentación es de 24ºC. Es sencillo poder distinguir las fases finales del proceso de fermentación ya que la presencia

de espuma sobre esta etapa y marca la entrada de la fermentación acética, dando inicio al proceso de oxidación del pulque. (Escalante et al., 2016).

2.2.4. Fermentación acética

La fermentación acética tiene como producto principal la obtención de ácido acético obtenido de la oxidación de azucares- alcoholes y etanol mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa y el aldehído deshidrogenasa, ambas teniendo acción en la membrana externa en *acetobacter s.p.* teniendo parte esencial durante la elaboración del pulque siendo la fermentación que da un marcaje a la etapa final de la elaboración del pulque. Es importante destacar que, si se tiene un descuido durante esta etapa, exponiéndolo durante más tiempo del requerido dotándolo de un sabor avinagrado, lo que resulta como un factor poco favorable para el producto. (Escalante et al., 2016).

2.3. Métodos de conservación del pulque

En cuanto a métodos de conservación hoy por hoy se han identificado pocos métodos de conservación del pulque, el primero partiendo de someter el pulque a temperaturas de pasteurización controladas, lo que tiene como consecuencia detener el proceso de fermentación, lo que facilita su estado y movilización, a mercados internacionales (Herrera, 1879).

Actualmente existen diversas técnicas para conservar alimentos, entre las que destaca la congelación. Su eficacia depende estrechamente de la temperatura: en general, el intervalo de −20 °C a −30 °C permite prolongar la vida de anaquel al ralentizar las reacciones bioquímicas e inhibir la actividad microbiana. Sin embargo, sus costos elevados y la limitada disponibilidad de infraestructura en regiones con pocos recursos pueden reducir su viabilidad y dificultar su estandarización.

Una de las alternativas para conservar el pulque es el uso de extractos naturales de plantas, junto con la pasteurización inhiben el crecimiento de microrganismos patógenos.

El comercio de pulque en México ha tomado un impulso significativo, que se acrecentar a pasos agigantados con un mercado de exportación en desarrollo direccionado mayoritariamente Europa. En la actualidad cerca del 90% de la producción nacional del pulque se exporta a países como Alemania y ucrania. Este fenómeno sigue precedentes marcados por otras bebidas tradicionales mexicanas, como el tequila y el mezcal, fungiendo como piedra angular en el posicionamiento del mercado internacional, teniendo como consecuencia, la captación de la atención por mercados más jóvenes. Dicho acrecentamiento en el interés del pulque por mercados internacionales y consumidores más jóvenes ha provocado un interés por invocar con sabores y experiencias distintas. Siendo que la Asociación Nacional De Pulquerías Tradicionales (ANPT) proyecta un crecimiento anual de alrededor de 10% en ventas. Dichas proyecciones están basadas en que la producción en 2021 fue de 184 millones de litros de maguey pulquero. Dicha cifra representa un crecimiento del 2.5% en comparación al año 2020 donde se produjeron 167.2 millones de litros según El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).

2.4. Métodos de conservación emergentes del pulque

Refrigeración: Mantener el pulque a bajas temperaturas es una de las maneras más efectivas de ralentizar la fermentación y evitar la proliferación de microorganismos. La refrigeración puede ayudar a conservar su sabor y textura, aunque a temperaturas muy bajas (por debajo de 4 °C) podría alterar su consistencia. (Escalante et al., 2016).

Pasteurización: Aunque el pulque es una bebida fermentada, la pasteurización controlada puede ser útil para reducir la cantidad de microorganismos sin afectar gravemente el sabor. Existen tratamientos térmicos de baja temperatura y corto tiempo (LTLT) y de alta temperatura y corto tiempo (HTST) que podrían adaptarse para el pulque. (Casp & Abril, 2003).

Envases herméticos y atmósferas modificadas: El envasado al vacío o en condiciones de atmósfera modificada (bajo nitrógeno o CO_2) puede ayudar a

reducir la oxidación y limitar el crecimiento de microorganismos. También, el uso de envases opacos puede proteger el pulque de la luz, que podría acelerar su degradación. (Fellows, 2018)

Uso de conservadores naturales: Algunos conservadores naturales, como el ácido láctico, ácido cítrico y algunos aceites esenciales, pueden ayudar a inhibir el crecimiento de bacterias y hongos en el pulque. Sin embargo, es necesario evaluar la dosis adecuada para no alterar el sabor.

Deshidratación y liofilización: Si bien es un método menos común para el pulque, la deshidratación o la liofilización (congelación y secado al vacío) podría ser una opción para conservarlo en polvo, manteniendo los sabores y propiedades nutricionales una vez rehidratado. (Casp & Abril, 2003).

Microfiltración: La microfiltración es una técnica que puede eliminar partículas grandes y algunos microorganismos sin la necesidad de calor. Sin embargo, es importante investigar cómo esta técnica afectaría la textura y los compuestos del pulque. (Fellows, 2018).

Fermentación controlada: Ajustar el proceso de fermentación con cultivos iniciadores específicos puede permitir un mejor control sobre la flora microbiológica y así extender la vida útil sin comprometer sus propiedades organolépticas. (Castro-Rodríguez et al., 2023).

2.4.1. Tipos de pasteurización

2.4.1.1. Pasteurización Lenta o LTLT (Baja Temperatura, Largo Tiempo)

Este método se realiza a 63ºC durante 30 minutos. Es la idea para alimentos sensibles al calor. Lo que trae como resultado una mayor conservación de propiedades organolépticas. Lo que lo convierte en una de las técnicas de pasteurización más utilizadas en productos como jugos y cervezas (Singh & Heldman, 2014)

2.4.1.2. Pasteurización Rápida o HTST (Alta Temperatura, Corto Tiempo)

Es utilizado en leche, cerveza y otros alimentos en estado líquido, este está basado en calentar por un periodo corto de tiempo y no son requeridos equipos muy especializados. Lo que lo convierte en una opción más asequible para la mayoría de las personas. El alimento es expuesto a temperaturas de 72º durante 1 segundos (Fellows, 2018).

2.4.1.3. Pasteurización Ultra Alta Temperatura o UHT (Ultra High Temperature)

La pasteurización es un proceso térmico diseñado para extender significativamente la vida útil de los alimentos líquidos. A diferencias de la pasteurización convencional, esta tiene como objetivo llevar a temperaturas más elevadas al alimento durante un periodo de tiempo más corto. Eliminando esporas y microrganismos. Dicho proceso puede alcanzar temperaturas de los 135ºc a 150ºc. Durante periodo de 2 a 5 segundos, para someterlo a un proceso de enfriamiento rápido para crear un shock térmico.

2.4.1.4. Pasteurización Instantánea o Flash (HTST)

También conocida como pasteurización de alta temperatura por corto tiempo. Es un proceso térmico ampliamente utilizado en la industria alimentaria para aminorar la presencia de microrganismo patógenos. Teniendo como intención evitar preservar la mayor cantidad de tiempo las características organolépticas del alimento. Teniendo un promedio de temperatura que va de los 72ºC a los 85ºC durante un periodo muy corto de tiempo. De 15 a 30 segundos para posteriormente enfriarlo de manera rápida, con la intención de evitar daños al producto.

2.4.1.5. Pasteurización a Alta Presión o HPP (High ressure Processing)

La pasteurización a altas presiones es un método de conservación de alimentos, que diferencia de los métodos de conservación de alimentos más convencionales, hace uso de altas presiones hidrostáticas en lugar de calor para inactivar a los organismos patógenos.

2.5. El Pulque como Alimento Funcional y Probiótico

Desde el punto de vista biotecnológico, el pulque se clasifica como un alimento funcional debido a su rica carga de microorganismos viables. Según la definición de la FAO/OMS, los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero. En el pulque, esta función es desempeñada principalmente por las Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).

Estudios realizados por Giles-Gómez et al. (2016) han demostrado que cepas aisladas de pulque, como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, poseen una alta capacidad de supervivencia ante las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, resistiendo los bajos niveles de pH del estómago y la acción de las sales biliares. Esta resistencia es fundamental, ya que garantiza que los microorganismos lleguen viables al colon para ejercer sus funciones biológicas.

Los beneficios específicos para el consumidor incluyen:

Modulación del Sistema Inmune: Las BAL del pulque interactúan con las células del epitelio intestinal, fortaleciendo la barrera inmunológica y ayudando en la prevención de infecciones gastrointestinales (Escalante et al., 2016).

Actividad Antimicrobiana: Estos microorganismos producen metabolitos secundarios como bacteriocinas y ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas.

Aporte Nutricional: Durante su metabolismo, las bacterias lácticas incrementan la biodisponibilidad de minerales y sintetizan vitaminas, principalmente del complejo B, que son absorbidas por el consumidor.

La preservación de esta viabilidad celular es uno de los retos principales de la presente investigación, ya que se busca que el tratamiento térmico de Pasteurización Flash sea lo suficientemente efectivo para detener el deterioro de

la bebida, pero lo suficientemente controlado para no eliminar por completo la carga probiótica que define al pulque artesanal.

3. Objetivos:

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento y la aplicación de pasteurización Flash sobre las propiedades fisicoquímicas, la viabilidad de microorganismos del pulque producido en Jiquipilco, Estado de México, con el fin de determinar las condiciones óptimas para su conservación y estandarización comercial.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar el perfil fisicoquímico de la carga de bacterias ácido-lácticas (BAL) del pulque artesanal de Jiquipilco, estableciendo una línea base de parámetros como pH, acidez titulable y grados Brix antes del tratamiento térmico.
- Determinar la eficiencia del proceso de pasteurización flash en la reducción de microorganismos alterantes (levaduras y bacterias acéticas) y su impacto en la supervivencia de las cepas con potencial probiótico mediante técnicas de recuento en placa.
- Monitorear la estabilidad del producto durante el almacenamiento, analizando los cambios en el color y los parámetros fisicoquímicos del pulque a través del tiempo, para establecer el periodo de vida útil bajo condiciones controladas de refrigeración.

4. Hipótesis:

El control de la temperatura de almacenamiento y la aplicación de procesos de pasteurización controlados aumentarán la vida de anaquel del pulque, preservando sus propiedades fisicoquímicas y su contenido de probióticos. Esto se logrará al reducir el crecimiento microbiano no deseado y las reacciones químicas que deterioran el producto, manteniendo su calidad y sus beneficios funcionales.

5. Metodología

5.1. Recolección de muestras

El pulque considerado para este estudio fue producido de manera artesanal por pequeños productores del municipio de Jiquipilco, Estado de México. Este enfoque artesanal asegura que el producto analizado sea representativo de las prácticas tradicionales de la región.

La recolección de las muestras se llevó a cabo directamente en los sitios de producción, utilizando recipientes estériles, esto garantiza la preservación de las características microbiológicas y fisicoquímicas del producto. Este procedimiento es fundamental para evitar la contaminación cruzada y asegurar la calidad de las muestras desde el momento de su obtención.

Una vez recolectadas, las muestras fueron transportadas al laboratorio de nanobiotecnología bajo condiciones controladas. Para ello, se congelaron de inmediato y se almacenaron en recipientes estériles diseñados para mantener la integridad del producto durante su traslado. Este método de conservación busca minimizar la alteración de las propiedades del pulque y garantizar que las muestras lleguen en óptimas condiciones para su análisis.

Finalmente, las muestras fueron analizadas en el laboratorio de nanobiotecnología del Departamento de Ciencias Básicas. Este análisis permitió caracterizar las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas del pulque artesanal, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de almacenamiento que contribuyan a alargar su vida de anaquel.

El diseño del proceso de producción, recolección, transporte y análisis descrito en este apartado es clave para garantizar la fiabilidad de los resultados y para sentar las bases de las recomendaciones que este trabajo de investigación propone en torno al mejoramiento de la conservación del pulque artesanal.

5.2. Pasteurización Flash de las muestras de pulque

Se evaluaron diferentes condiciones de pasteurización, considerando la temperatura y el tiempo de exposición como variables independientes. Los tratamientos experimentales consistieron en la aplicación de un tratamiento térmico a 80 °C durante 15, 30 y 60 segundos, realizando este procedimiento por triplicado y utilizando como control el pulque sin pasteurizar.

El proceso de pasteurización se realizó utilizando una parrilla de calentamiento equipada con un termómetro para el monitoreo de la temperatura. Una vez alcanzada la temperatura establecida, las muestras se mantuvieron durante el tiempo correspondiente a cada tratamiento. Posteriormente, se realizó un enfriamiento rápido mediante la colocación del recipiente en un baño de hielo, con el propósito de detener el efecto del tratamiento térmico y obtener las condiciones de pasteurización establecidas.

El pulque pasteurizado y sin pasteurizar se almacenó por 30 y 120 días para evaluar sus diferencias fisicoquímicas y microbiológicas.

5.3. Análisis fisicoquímico del pulque

Para asegurar la armonía en las características del pulque a lo largo de los diferentes lotes analizados, se realizó la evaluación de una serie de parámetros fisicoquímicos fundamentales. Los análisis fueron llevados a cabo en muestras representativas de cada lote y contemplan las siguientes determinaciones: pH, grados Brix, acidez titulable, azúcares reductores, porcentaje de alcohol, color, contenido de proteínas. Estos parámetros fueron determinados utilizando métodos analíticos previamente validados y normalizados, asegurando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. Los datos obtenidos servirán como base para establecer criterios que permitan garantizar la calidad y consistencia del producto final en condiciones de almacenamiento controladas.

5.3.1. Determinación de pH

Para la medición del pH, se tomó una muestra de 100 mL de pulque, la cual fue vertida en un vaso de precipitado previamente limpio y seco. Posteriormente, se introdujo un electrodo de pH calibrado en la muestra, asegurándose de que este quede completamente sumergido. La medición se llevó a cabo manteniendo el sistema en reposo durante aproximadamente 2 minutos, tiempo necesario para estabilizar la lectura y garantizar la obtención de resultados confiables.

5.3.2. Determinación del porcentaje de acidez

El grado de ácido láctico, el cual es el principal ácido presente en el pulque, se determinó mediante titulación. Para ello, se tomó una muestra de 9 ml de pulque y se vertió en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. A la muestra se le añadieron 4 gotas de fenolftaleína como indicador. Luego, se realizó la titulación con una solución de NaOH al 0.1 N, utilizando 25 ml de la solución, hasta que la muestra adquirió un tono ligeramente rosa, lo que indicó el punto final de la titulación.

5.3.3. Determinación de grados de alcohol

El grado alcohólico del pulque se midió con un alcohómetro. Se tomó una muestra de 250 ml de pulque y se vertió en una probeta. Posteriormente, se introdujo el alcohómetro en la muestra y se registró el grado alcohólico en función de la densidad del líquido.

5.3.4. Determinación de grados Brix

Para determinar los grados Brix, se utilizó un refractómetro. Se colocó una gota de pulque sobre el prisma del refractómetro y, a continuación, se observó la lectura a contraluz para registrar el valor correspondiente en grados Brix, lo que indicó la cantidad de sólidos solubles en la muestra.

5.3.5. Determinación de color

El color de las muestras de pulque fue evaluado mediante un colorímetro. Este instrumento proporcionó una medición cuantitativa del color de las muestras, lo que permitió una evaluación objetiva de las características cromáticas del pulque.

5.4. Determinación de proteínas solubles

La determinación de proteínas solubles se realizó mediante el uso de una técnica espectrofotométrica, basada en la formación de proteínas solubles en conjunto con el colorante Comassie. La unión del pigmento a la proteína es un proceso que dura alrededor de 2 minutos.

Preparación del reactivo proteína soluble

Se disolvieron 100mg del colorante Azul de Comassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. Posterior a eso se agregaron 100 ml de Ácido fosfórico al 85% (p/v), diluido y aforado en agua destilada a 1 L manteniéndose a condiciones de luz controlada y temperatura ambiente. Se preparó una curva de calibración usando albumina sérica bovina como estándar, las muestras fueron medidas a 595 de absorbancia

5.5. Análisis microscópico del pulque fresco

Se realizó un análisis microscópico de una muestra de pulque fresco con la finalidad de observar las características morfológicas y la reacción a la tinción de Gram de los microorganismos presentes. Para ello, se colocó una pequeña cantidad de muestra sobre un portaobjetos limpio y se realizó un frotis, el cual se dejó secar al aire y posteriormente se fijó.

El frotis se sometió a la tinción de Gram, utilizando cristal violeta, lugol, decolorante y safranina, de acuerdo con el procedimiento convencional. Finalmente, la preparación se observó mediante microscopía óptica utilizando el objetivo de inmersión (100×), registrándose la morfología, agrupación y coloración de las células observadas.

5.6. Cuantificación de probióticos

Las muestras de pulque se homogenizaron cuidadosamente antes de su análisis. Se realizó una dilución inicial de 1:10, transfiriendo 1 mL de muestra a 9 mL de solución salina fisiológica estéril o diluyente apropiado. A partir de esta suspensión se efectuaron diluciones decimales seriadas.

De las diluciones seleccionadas se inocularon un volumen conocido sobre el medio de cultivo correspondiente al grupo microbiano de interés.

Para bacterias ácido-lácticas se utilizaró el medio de cultivo (de Man, Rogosa y Sharpe). Las placas se incubaron bajo condiciones apropiadas a 37 °C durante 48 h. Después del periodo de incubación se seleccionaron las placas que presenten un número de colonias adecuado para el recuento y se contabilizaron las colonias desarrolladas. Los resultados se expresaron como UFC/mL

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$UFC/mL = \frac{N}{V \times D}$$

donde:

- N = número de colonias contadas.
- V = volumen inoculado (mL).
- D = dilución correspondiente.

6. Resultados y Discusión

Actualmente no existe un método completamente efectivo para la conservación del pulque a nivel industrial, por lo que resulta necesario desarrollar nuevas estrategias de conservación que permitan prolongar su vida útil sin alterar sus características tradicionales. Sin embargo, dichos métodos deben ser compatibles con la normatividad vigente para la evaluación fisicoquímica del pulque, particularmente con la norma **NMX-V-037-1972 "Pulque manejado a granel–Clasificación y características"**, la cual establece los parámetros de calidad que debe cumplir esta bebida fermentada.

De acuerdo con la norma **NMX-V-037-1972**, el pulque se clasifica en dos tipos principales (Tabla 1):

Tabla 1. Tipos de pulque

Tipo de pulque	**Descripción**
Pulque Tipo I	Corresponde al **pulque semilla** (y en algunos estudios también incluye la "punta"). Es el pulque utilizado como inóculo o fermento para iniciar la fermentación del aguamiel. Se caracteriza por tener una mayor actividad microbiana y un mayor contenido alcohólico.
Pulque Tipo II	Corresponde al **pulque comercial**, es decir, el producto final destinado al consumo y venta al público. Presenta menor contenido alcohólico y menor concentración de azúcares fermentables en comparación con el Tipo I.

Fuente: Norma **NMX-V-037-1972**

Entre los principales aspectos evaluados se encuentran las propiedades organolépticas, así como parámetros fisicoquímicos relacionados con la acidez, contenido alcohólico, azúcares y características de viscosidad propias del producto.

Tabla 2. Valores de referencia de los parámetros fisicoquímicos según la norma **NMX-V-037-1972**

Parámetro	**Tipo I**		**Tipo II**	
	Mínimo	**Máximo**	**Mínimo**	**Máximo**
Índice de Refracción (inmersión 20 °C)	32	35	25	ND
Índice de Refracción (Abbé, 20°C)	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380
pH	>3.7	4.2	3.5	4
Ácidez Total (ácido láctico)	0.4	0.75	0.4	0.7
Azúcares reductores (g/100 mL)	0.1	0.8	0.2	0.5
Grado alcohólico (% vol/vol)	6	9	4	6

En este trabajo se busca obtener un método de conservación con la finalidad de que los pequeños productores del estado de México puedan distribuir su producto a nivel nacional, sin las dificultades que

6.1. Determinación del pH

Los resultados de esta investigación se muestran en la Figura 4 en la cual se visualiza la evolución del pH en muestras de pulque evaluadas en dos periodos de almacenamiento (1 mes y 4 meses), posteriores a al proceso de

pasteurización flash a 80 °C durante diferentes tiempos de exposición (15, 30 y 60 segundos), además de un tratamiento control sin pasteurización.

Los resultados obtenidos indican que no se presentaron diferencias significativas en los valores de pH entre los distintos tratamientos ni entre los tiempos de almacenamiento evaluados. Este comportamiento puede atribuirse a la capacidad de los microorganismos probióticos presentes en el pulque para mantener la homeostasis del pH tanto intracelular como extracelular mediante diversos mecanismos metabólicos y rutas catabólicas (Lara González et al., 2025). Entre estos mecanismos destacan la regulación del transporte de protones, la actividad de bombas H^+-ATPasa, así como sistemas de descarboxilación de aminoácidos y producción de compuestos amortiguadores, los cuales contribuyen a estabilizar el ambiente celular y el medio circundante frente a cambios de acidez (Lund et al., 2014).

Asimismo, bacterias ácido-lácticas y otros microorganismos fermentativos asociados al pulque poseen mecanismos adaptativos que les permiten tolerar condiciones de estrés ácido y mantener relativamente estable el pH del sistema durante el almacenamiento, incluso después de tratamientos térmicos moderados. Estos procesos son fundamentales para la supervivencia microbiana y la conservación de las características fisicoquímicas del producto fermentado.

También es importante destacar que el valor de pH del pulque analizado se encontró dentro de los parámetros de referencia establecidos por la norma **NMX-V-037-1972**, de acuerdo con el tipo II, lo cual indica que el producto mantiene las características fisicoquímicas adecuadas y compatibles con los criterios de calidad establecidos para esta bebida fermentada.

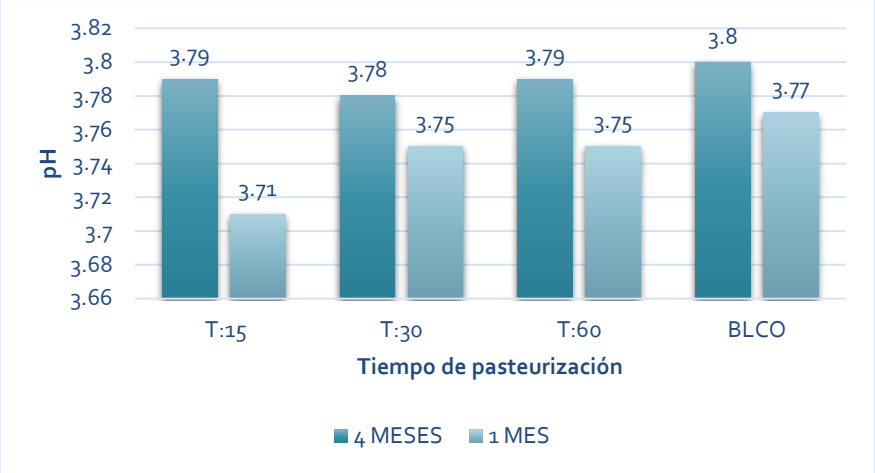


FIGURA 4. EVOLUCIÓN DEL PH DEL PULQUE DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN FLASH DURANTE UN TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE 1 Y 4 MESES.

6.2. Contenido de alcohol

En el proceso de fermentación tradicional, el cual fue utilizado para la producción del pulque analizado en este trabajo, el pulque fermentado final no se somete a ningún proceso de estabilización (por ejemplo, pasteurización) para detener la actividad microbiana responsable de la fermentación. Los pequeños productores tradicionales de pulque realizan todas las etapas descritas anteriormente y venden el pulque fermentado directamente del tinacal durante el día o en mercados locales

En la gráfica número 5 muestra el comportamiento de los grados de alcohol con los diferentes tratamientos a lo largo de 1 y 4 meses de almacenamiento. Según las mediciones obtenidas, el pH no se altera significativamente con el tiempo.

Lo que podría verse directamente relacionado con el dato de la gráfica 1. Ya que al reducir el afecto de la fermentación no solo se mantienen los grados de alcohol si no que es un indicativo de que la tras la pasteurización las condiciones del pulque no se ven comprometidas con el tiempo, lo que podría alagar la vida de anaquel del pulque.

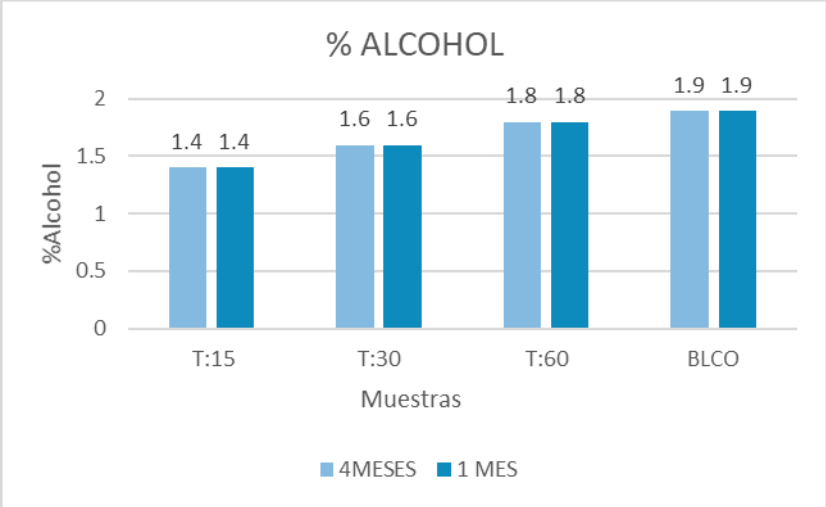


*FIGURA 5. **EVOLUCIÓN DÉ % DE ALCOHOL EN EL PULQUE***

6.3. Grados Brix

En este grafico (Figura 6) se muestra la evolución de los grados Brix en muestras de pulque sometidas a diferentes tiempos de pasteurización a 80°C (15 segundos, 30 segundos y 60 segundos) junto con un control sin pasteurizar. Los valores fueron medidos de 1 mes y 4 meses de almacenamiento, permitiendo observar cómo cambia el contenido de azucares solubles en el tiempo.

Es posible observar que el nivel de % Brix se mantiene constante en 5 tanto en el primer mes, como el cuarto mes de la pasteurización. Sin variaciones significativas. Lo que sugiere que la pasteurización ha logrado estabilizar el contenido de azucares fermentables en el pulque. La muestra sin pasteurizar, a un mes el nivel de %Brix es de 5, similar a las muestras pasteurizadas a 4 meses de la pasteurización el nivel de %Brix aumenta a 5.5 lo que indica que hay una acumulación de azucares solubles en el tiempo. Este aumento podría deberse a procesos de hidrolisis de polisacáridos presentes en el pulque o en la actividad enzimática de microrganismos no eliminados por la pasteurización.

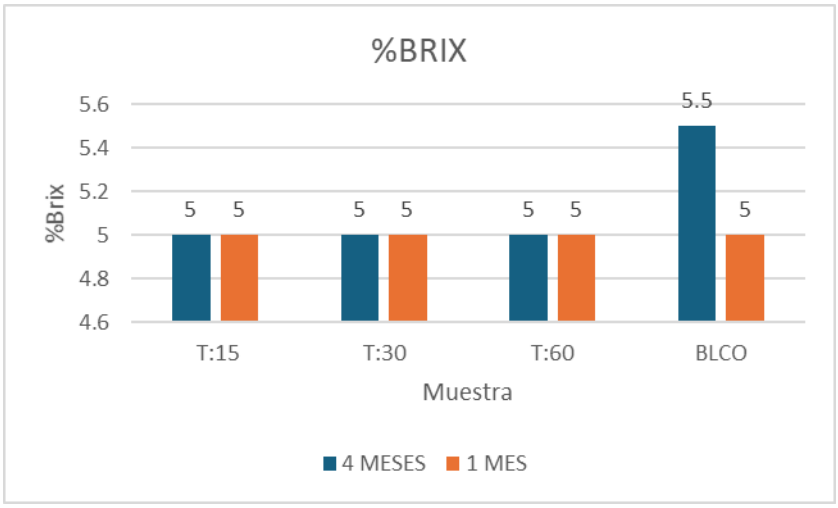


FIGURA 6. EVOLUCIÓN DE % BRIX EN MUESTRAS TRAS LA PASTEURIZACION FLASH

6.4. Contenido de ácido láctico

El gráfico 7 muestra las pruebas de pulque en dos tiempos distintos1 mes y 4 meses, seguido de su procesamiento. Las muestras fueron sometidas a pasteurización de 80°C a 15 segundos,30 segundos y 60 segundos además de un control sin pasteurización (blanco).

En el primer mes la concentración de ácido láctico es baja y prácticamente en todas las condiciones. Por otra parte, durante el mes 4 se puede observar un aumento significativo en la concentración de ácido láctico en todas las muestras. Lo que indica una fuerte actividad de fermentación láctica a con el paso del tiempo.

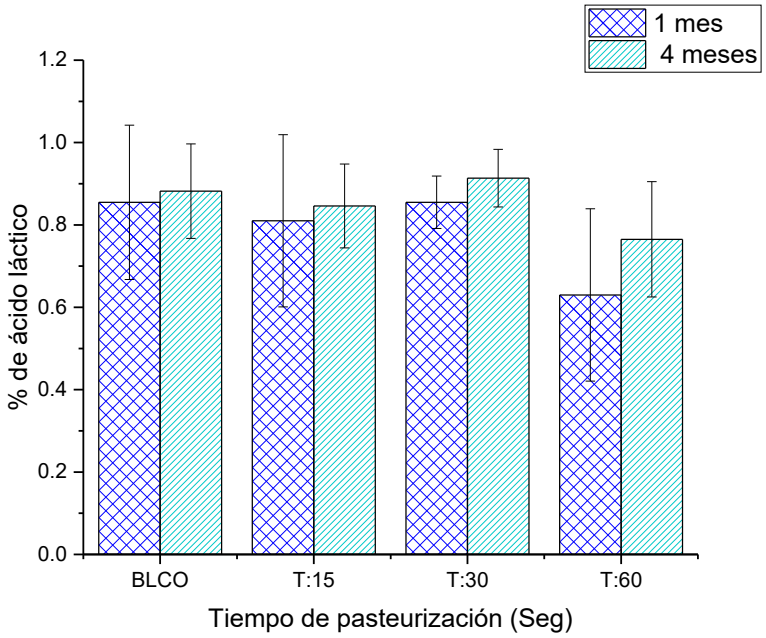


FIGURA 7. ***% DE ÁCIDO LÁCTICO DEL PULQUE EN ALMACENAMIENTO 1 Y 4 MESES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN FLASH***

6.5. Azúcares reductores

La Figura 8 muestra el comportamiento de los **azúcares reductores (mg/L)** en pulque sometido a diferentes tiempos de pasteurización y evaluado después de uno y cuatro meses de almacenamiento. En el tratamiento control (BLCO), se observó un contenido de azúcares reductores cercano a **5,500 mg/L**, sin diferencias marcadas entre ambos periodos de almacenamiento, lo que indica que, bajo las condiciones evaluadas, el almacenamiento por sí solo no produjo modificaciones importantes en el contenido de estos compuestos.

Después de **un mes de almacenamiento**, el tratamiento de **15 min de pasteurización (T:15)** presentó el mayor contenido de azúcares reductores, aproximadamente **8,500 mg/L**, seguido de T:30, con alrededor de **8,300 mg/L**, mientras que T:60 presentó un valor cercano a **7,900 mg/L**. En comparación con

el control, estos tratamientos representan un incremento considerable en la concentración de azúcares reductores. Este comportamiento podría estar relacionado con el efecto del tratamiento térmico sobre la matriz del pulque, ya que el calentamiento puede favorecer la **solubilización y disponibilidad de carbohidratos** y, dependiendo de la composición del producto, la transformación de carbohidratos complejos en moléculas de menor tamaño. Sin embargo, esta interpretación debe considerarse como una posible explicación y no como evidencia directa de hidrólisis, a menos que se hayan determinado específicamente los carbohidratos presentes.

Después de **cuatro meses**, se observó un comportamiento diferente. El tratamiento T:15 presentó una disminución hasta aproximadamente **5,000 mg/L**, mientras que T:30 alcanzó cerca de **5,900 mg/L** y T:60 aproximadamente **7,200 mg/L**. Por lo tanto, a este tiempo de almacenamiento se observa una tendencia hacia mayores concentraciones de azúcares reductores conforme aumenta el tiempo de pasteurización. Este comportamiento podría estar relacionado con modificaciones de los carbohidratos durante el almacenamiento y con la estabilidad de los componentes de la bebida después del tratamiento térmico. En particular, el mayor valor observado en T:60 podría indicar que el tratamiento térmico más prolongado favoreció una mayor disponibilidad de azúcares reductores que permanecieron detectables durante el periodo de almacenamiento.

Una observación relevante es que **el efecto del tiempo de pasteurización no fue constante durante el almacenamiento**. A un mes, T:15 presentó el valor máximo, mientras que a cuatro meses el mayor contenido correspondió a T:60. Esto sugiere una posible **interacción entre el tiempo de pasteurización y el tiempo de almacenamiento**, por lo que el comportamiento de los azúcares reductores no debería interpretarse considerando únicamente uno de estos factores. Los cambios podrían resultar de la combinación entre las modificaciones ocasionadas por el tratamiento térmico y las transformaciones que ocurren durante el almacenamiento.

En términos tecnológicos, el contenido de azúcares reductores es un parámetro relevante debido a que estos compuestos constituyen **sustratos potencialmente disponibles para microorganismos fermentativos** y pueden influir en las características fisicoquímicas y sensoriales del pulque. Por ello, el incremento o disminución de estos azúcares durante el almacenamiento puede estar relacionado con cambios en la estabilidad y calidad del producto.

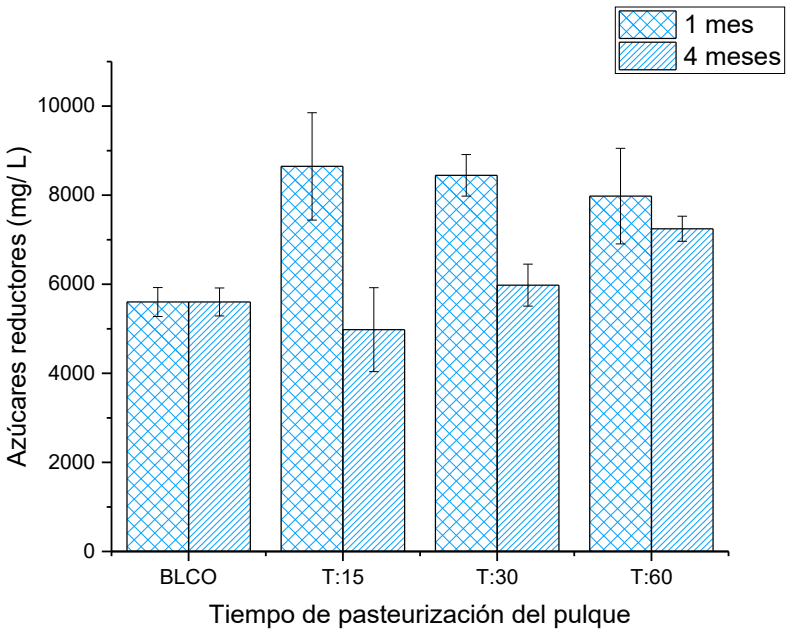


*FIGURA 8. **EVOLUCIÓN DE AZUCARES REDUCTORES LUEGO DE LA PASTEURIZACIÓN FLASH***

6.6. Determinación del color

También en este proyecto se realizó un análisis de color; a simple vista, las muestras pasteurizadas tienen un color amarillento en comparación con la muestra control, la cual se ve de aspecto blanquecino (Figura 8).



FIGURA 9. ***MUESTRAS DE PULQUE DURANTE EL PROCESO DE COLORIMETRÍA***

Se midieron los parámetros CIEL lab con un colorímetro portátil vinkcolor. Los resultados se muestran en la Tabla 2, en donde se muestra que los parámetros L, a y b son diferentes en la muestra del pulque fresco, respecto al pulque pasteurizado. La luminosidad (L)disminuye con la pasteurización, mientras que el color amarillo (b) se incrementa cuando el pulque está pasteurizado.

TABLA 1. ***ANÁLISIS DE COLORIMETRÍA DE MUESTRAS DE PULQUE ANTES Y DESPUÉS DE PASTEURIZACIÓN FLASH.***

	PF	T1	T2	T3
L	99.5	98.5	98.6	98.6
A	-0.1	-0.1	0.2	0.2
b	0.1	0.8	0.6	0.6

6.7. Análisis microscópico del pulque fresco

La observación microscópica del pulque fresco permitió identificar tres grupos microbianos asociados con la fermentación del producto: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 10a), la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 10b) y bacterias del género *Lactobacillus* (Figura 10c). La presencia simultánea de levaduras y bacterias ácido-lácticas es consistente con

la naturaleza microbiológicamente compleja y dinámica del pulque, cuya fermentación resulta de la actividad conjunta de diferentes microorganismos.

En la Figura 10a, correspondiente a *S. cerevisiae*, se observan células de morfología ovalada a esférica, características de las levaduras, algunas de ellas agrupadas y con apariencia compatible con procesos de gemación. La presencia de esta levadura es relevante debido a su capacidad para metabolizar los azúcares disponibles en el aguamiel y producir etanol y CO_2, contribuyendo directamente al proceso fermentativo. Además, su actividad metabólica genera productos que pueden modificar las condiciones del medio y favorecer o limitar el desarrollo de otros microorganismos presentes en el pulque.

En la Figura 10b se observa una población bacteriana abundante, con células de morfología cocoide, compatibles con bacterias del género *Leuconostoc*. *L. mesenteroides* es una bacteria ácido-láctica asociada a procesos fermentativos de vegetales y bebidas tradicionales. Su metabolismo puede contribuir a la producción de ácido láctico, CO_2 y otros metabolitos, dependiendo de las condiciones de crecimiento y de los sustratos disponibles. Estos metabolitos participan en la acidificación y en el desarrollo de las características sensoriales del producto.

Por otra parte, en la Figura 9c se observan células bacterianas de morfología bacilar, compatibles con *Lactobacillus* spp.. Las bacterias de este grupo tienen particular importancia en la fermentación debido a su capacidad para utilizar carbohidratos y producir principalmente ácido láctico, contribuyendo a la disminución del pH del medio. Esta acidificación puede ejercer un efecto selectivo sobre la microbiota y participar en la estabilidad microbiológica y en las características organolépticas del pulque.

En conjunto, la presencia de *S. cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus* spp. evidencia la participación de diferentes grupos microbianos durante la fermentación del pulque. La interacción entre las levaduras y las bacterias ácido-lácticas puede ser determinante para la transformación de los

carbohidratos, producción de metabolitos y desarrollo de las características propias de esta bebida tradicional.

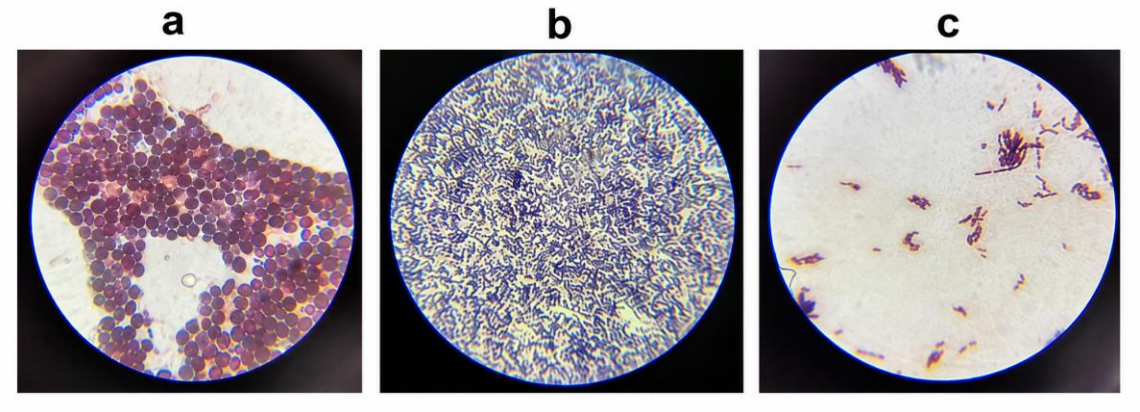


FIGURA 10. MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS PRESUNTIVAMENTE MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA EN UNA MUESTRA DE PULQUE FRESCO. A) *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, B) *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* Y C) *LACTOBACILLUS* SPP

6.8. Contenido de probióticos

La Figura 11 presenta el contenido de microorganismos probióticos, expresado como **UFC/mL**, en pulque sin pasteurizar (BLCO) y sometido a diferentes tiempos de pasteurización (15, 30 y 60 s), después de uno y cuatro meses de almacenamiento. En términos generales, los resultados muestran una **disminución marcada de la población microbiana viable como consecuencia de la pasteurización**, lo que evidencia la sensibilidad de los microorganismos presentes en el pulque frente al tratamiento térmico.

En el tratamiento **BLCO**, correspondiente al pulque sin pasteurizar, se observó el mayor contenido microbiano durante el primer mes de almacenamiento, con un valor aproximado de **9.5×10^3 UFC/mL**. Después de cuatro meses, este valor disminuyó hasta aproximadamente **2.6×10^3 UFC/mL**. Esta reducción puede atribuirse a la disminución progresiva de la viabilidad microbiana durante el almacenamiento, asociada con cambios en las condiciones fisicoquímicas del

producto, agotamiento de nutrientes, acumulación de metabolitos y modificación del ambiente durante la conservación.

En contraste, los tratamientos pasteurizados presentaron concentraciones considerablemente menores desde el primer mes. El tratamiento de **15 s** mostró aproximadamente **4.5 × 10² UFC/mL**, mientras que los tratamientos de **30 y 60 s** presentaron valores todavía menores. Este comportamiento evidencia que incluso el tratamiento térmico de menor duración evaluado tuvo un efecto importante sobre la población microbiana viable.

La reducción de microorganismos después de la pasteurización puede explicarse por la **inactivación térmica de células vegetativas**, ya que el incremento de la temperatura provoca alteraciones en proteínas, membranas celulares, sistemas enzimáticos y otros componentes esenciales para la supervivencia microbiana. En este sentido, el incremento del tiempo de exposición al tratamiento térmico favorece una mayor reducción de la población viable.

Un aspecto relevante es que **la mayor disminución se observa entre el pulque sin pasteurizar y los tratamientos pasteurizados**, mientras que las diferencias entre 15, 30 y 60 s parecen ser mucho menores. Esto podría indicar que, bajo las condiciones utilizadas, una parte importante de la población microbiana susceptible al calor fue eliminada incluso durante los primeros segundos del tratamiento.

Después de cuatro meses de almacenamiento, los tratamientos pasteurizados mantuvieron concentraciones de microorganismos viables muy bajas. Esto sugiere que el efecto de la pasteurización no solamente reduce la población inicial, sino que puede modificar la comunidad microbiana del producto y limitar la cantidad de microorganismos capaces de permanecer viables durante el almacenamiento.

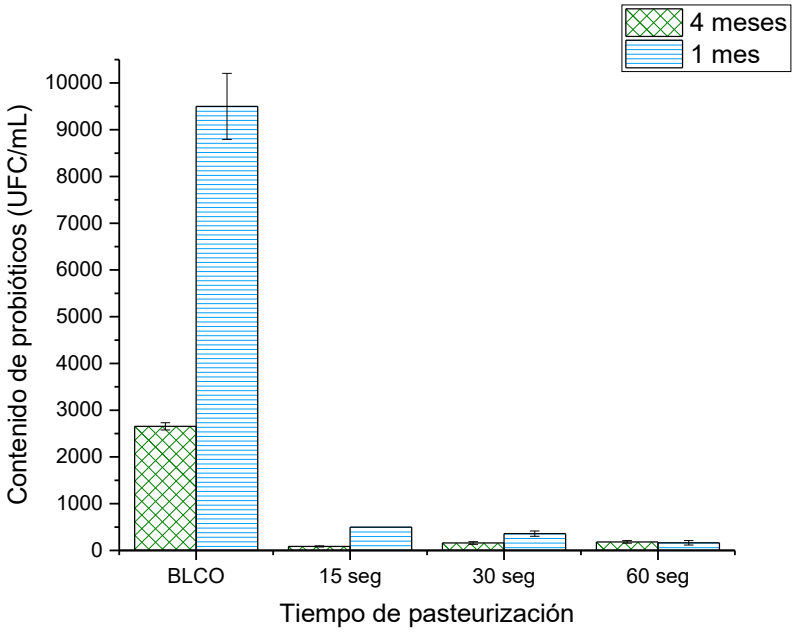


FIGURA 11. CONTENIDO DE PROBIÓTICOS EN EL PULQUE ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN ALMACENAMIENTO POR 1 Y 4 MESES

7. Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la pasteurización flash es una estrategia viable para extender la vida de anaquel del pulque artesanal sin alterar drásticamente sus características fisicoquímicas. Se observó que la pasteurización a 30 segundos y 80°C mantiene un equilibrio adecuado entre la estabilidad microbiológica y la conservación de propiedades organolépticas, permitiendo minimizar la actividad de microorganismos no deseados mientras se preservan algunos probióticos esenciales.

El análisis de pH indicó que las muestras pasteurizadas presentaron una menor variación en comparación con el control sin pasteurizar, lo que sugiere una reducción en la fermentación espontánea durante el almacenamiento. Asimismo, los valores de °Brix y azúcares reductores permanecieron más estables en las muestras tratadas térmicamente, favoreciendo la conservación del perfil sensorial del pulque. Por otro lado, aunque la pasteurización a 60 segundos mostró una mayor estabilidad química, también redujo significativamente la viabilidad de los probióticos, lo que podría afectar los beneficios funcionales de la bebida.

En conclusión, la pasteurización flash a 30 segundos representa la mejor alternativa para prolongar la vida útil del pulque sin comprometer en exceso su perfil microbiológico y nutricional. No obstante, futuras investigaciones podrían explorar métodos complementarios, como el uso de envases anaeróbicos o la reintroducción de cultivos probióticos post-pasteurización, para maximizar la conservación de sus propiedades tradicionales y funcionales. Este estudio sienta las bases para el desarrollo de estrategias de conservación que permitan la comercialización del pulque a gran escala, asegurando su calidad y autenticidad.

8. **Referencias bibliográficas**

1. Barbosa Rojo M.E. producción de pulque y curados enlatados. Informe técnico de la opción curricular en la modalidad de: microempresa que para obtener el título de ingeniero en alimentos. 2013. Instituto politécnico nacional unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología.
2. Chagua Rodríguez P., Malpartida Yapias R.J., Ruíz Rodríguez A. Tiempo de pasteurización y su respuesta en las características químicas y de capacidad antioxidante de aguamiel de Agave americana L. Rev. investig. Altoandin. vol.22 no.1 Puno ene/mar. 2020
3. Viesca-González F.C., Quintero Salazar B,;Barrera García V.D. El pulque en jiquipilco, estado de méxico: su producción, comercialización y consumo. 2018
4. Rojas Rivas E., Viesca González F.C. El maguey, el pulque y las pulquerías de Toluca, Estado de México, ¿patrimonio gastronómico turístico? 2016. PASOS. Revista de Turismo y Patrimonio Cultural, vol. 14, núm, pp. 1199-1215
5. Arroyo Cruz C., Reynoso-ocampo C.A. Efecto de las bajas temperaturas en las características fisicoquímicas del pulque (Agave salmiana Xamini) Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital Recibido. 2016.
6. J. Hernández-Ruiz, L. Pérez-Becerra. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos Gil-Leonides et al. /Vol. 5 (2020) 733-737 733 Variables de calidad en la producción de pulque en la comunidad el Copal, Irapuato, Guanajuato L.
7. Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. (2004) FEMS Microbiol Lett. 235: 273-279.

8. Escalante A, Giles-Gómez M; Hernández G; Córdova-Aguilar MS, López-Munguía A, Gosset G, Bolívar B. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. (2008) Int. J Food Microbiol. 124:126-134.
9. Espino Garibay, David Francisco. Clasificación molecular de Satureja macrostema (Benth) Briq. y Eryngium carlinae Delar F. y evaluación de la actividad antimicrobiana de sus terpenoides. 2010. Repositorio Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestría
10. Becker, J., “Pulque: Beverage Transcending Historical Boundaries,” Fermentation (MDPI), 2024.
11. Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-López, J. A., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Beverage: History, Plant and Fermentation Microbiology. Frontiers in Microbiology, 7, 1026. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026
12. Figueredo - Urbina, C., Arce – Cervantes,O.,Castañeda-Ovando,A. (2024). Diversidad de agaves utilizados para la producción de jarabe de aguamiel en el estado de Hidalgo, México. DOI: 10.18387/polibotanica.58.19
13. SIAP. (2024). Panorama Agroalimentario: Análisis de la producción de cultivos industriales en México (Maguey Pulquero). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER).
14. Cervantes-Elizarrarás,A., et al. (2017) preobiotic potential of expolysaccharides from lactic acid bacteria isolated from pulque. Journal of fuctional foods, 33, 301-307.
15. Ruiz-Ramírez Y, Valadez-Blanco R, Calderón-García C, Chikindas ML, Ponce-Alquicira E. Probiotic and functional potential of lactic acid bacteria

isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications. Front Microbiol. 2023 Sep 12;14:1241581. doi: 10.3389/fmicb.2023.1241581. PMID: 37779722; PMCID: PMC10536145.

16. **Escalante, A., et al. (2016).** *Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Beverage: History, Plant and Fermentation Microbiology*. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1026.
17. **Swings, J., & De Ley, J. (1977).** *The Biology of Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, 41(1), 1-46.
18. Asociación Nacional de Pulquerías Tradicionales (ANPT). 2020
19. 12Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020.
20. Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage: History, plant and fermentation microbiology. Frontiers inMicrobiology, 7, 1026. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026
21. Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., & Yáñez-Fernández, J. (2023). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications. Frontiers in Microbiology, 14, Article 1241581. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1241581
22. Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., & Yáñez-Fernández, J. (2023). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications. Frontiers in Microbiology, 14, Article 1241581. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1241581
23. Singh, R. P., & Heldman, D. R. (2014). Introduction to Food Engineering (5ta ed.). Academic Press.
24. Fellows, P. J. (2018). Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y práctica (4ta ed.). Editorial Acribia.

25. Asociación Nacional de Pulquerías Tradicionales (ANPT). (2020). Estado actual de la producción y consumo del pulque en México. [Documento técnico].
26. Casp, A., y Abril, J. (2003). Procesos de conservación de alimentos (2da ed.). Ediciones Mundi-Prensa.

27. Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., y Yáñez-Fernández, J. (2023). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from pulque and evaluation of their safety for food applications. Frontiers in Microbiology, 14, Artículo 1241581. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1241581
28. Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., y Bolívar, F. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage: History, plant and fermentation microbiology. Frontiers in Microbiology, 7, 1026. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026
29. Fellows, P. J. (2018). Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y práctica (4ta ed.). Editorial Acribia.
30. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020). Panorama Agroalimentario 2020. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. https://www.gob.mx/siap
31. Singh, R. P., y Heldman, D. R. (2014). Introduction to Food Engineering (5ta ed.). Academic Press.
32. Swings, J., y De Ley, J. (1977). The Biology of Zymomonas. Bacteriological Reviews, 41(1), 1-46. https://doi.org/10.1128/br.41.1.1-46.1977

6.9.