



# Effect of ozonation on the shelf life of aguamiel

## Impacto de la aplicación de ozono en la vida de anaquel de aguamiel

Alejandra Cristina Corona-Pérez<sup>1,2</sup>; Lyzbeth Hernández-Ramos<sup>3</sup>;  
María del Rosario García-Mateos<sup>2</sup>; Adalberto Gómez-Cruz<sup>2</sup>;  
Salvador Martínez-Romero<sup>2</sup>; Joel Corrales-García<sup>2</sup>; Ma. Carmen Ybarra-Moncada<sup>2\*</sup>

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

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

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

\*Corresponding author: mybarram@chapingo.mx, tel. 595 952 1500.

### Abstract

**Introduction:** Aguamiel develops a microbial community that ferments its sugars and lowers its bioactive compound levels. The use of ozone in food has proven to be an effective strategy to extend shelf life by reducing microbial load.

**Objective:** To evaluate the effect of ozone application on microbiological, physicochemical, and nutraceutical quality of aguamiel from *Agave salmiana*.

**Methodology:** Aguamiel was extracted from agave pulquero grown in Coatepec, Estado de México. Three ozone application times (0, 6, and 12 minutes) were established at a concentration of 0.2 g O<sub>3</sub>·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. The evaluated variables were total microbial population (TMP), pH, total soluble solids (TSS), titratable acidity, ethanol concentration (%), total phenolic compounds, and antioxidant activity after 0, 12, 24, and 48 hours of storage (25.44 ± 1.18 °C). Additionally, the effect of re-ozonation was monitored between 48 and 72 hours of storage

**Results:** Ozone application for 6 and 12 minutes kept the TMP low (between 6.10 and 6.40 log<sub>10</sub>·mL<sup>-1</sup>) during the first 24 hours compared to the control (up to 6.63 log<sub>10</sub>·mL<sup>-1</sup>). However, these treatments did not preserve the physicochemical (pH and TSS) or nutraceutical properties of aguamiel during storage.

**Study limitations:** The potential synergistic effect of ozone with other preservation methods on microbiological, physicochemical, and nutraceutical stability of aguamiel should be evaluated.

**Originality:** Ozonation could be an alternative and cost-effective method to reduce the microbiological activity of aguamiel.

**Conclusions:** The use of ozone assisted in preserving a low TMP during 24 hours of storage.

**Keywords:** *Agave salmiana*,  
microbiological stability,  
physicochemical properties,  
bioactive compounds.

### Resumen

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

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

**Metodología:** El aguamiel se extrajo de maguey pulquero cultivado en Coatepec, Estado de México. Se establecieron tres tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) a una concentración de 0.2 g O<sub>3</sub>·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Las variables evaluadas fueron la población total de microorganismos (PTM), pH, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, concentración de etanol (%), compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante después de 0, 12, 24 y 48 h de almacenamiento (25.44 ± 1.18 °C). Asimismo, se monitoreó el efecto de la reozonización entre las 48 y 72 h de almacenamiento.

**Resultados:** La aplicación de ozono durante 6 y 12 min mantuvo baja la PTM (entre 6.10 y 6.40 log<sub>10</sub>·mL<sup>-1</sup>) durante las primeras 24 h en comparación con el testigo (hasta 6.63 log<sub>10</sub>·mL<sup>-1</sup>). Sin embargo, estos tratamientos no conservaron las propiedades fisicoquímicas (pH y SST) ni nutracéuticas del aguamiel durante el almacenamiento.

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

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

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

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

Please cite this article as follows (APA 7): Corona-Pérez, A. C., Hernández-Ramos, L., García-Mateos, M. R., Gómez-Cruz, A., Martínez-Romero, S., Corrales-García, J., & Ybarra-Moncada, M. C. (2025). Effect of ozonation on the shelf life of aguamiel. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 17, e24010. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2024.03.010>



Ingeniería Agrícola  
y Biosistemas

## Introduction

Aguamiel is the sap extracted from various species of pulque agave, mainly *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, and *A. salmiana* (Enríquez-Salazar et al., 2017), and it is a natural source of sugars, proteins, amino acids, and minerals. Furthermore, due to the presence of phenolic compounds, fructooligosaccharides, saponins, and vitamin C, it can be considered a beverage with nutraceutical potential (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018). Traditionally, aguamiel is used to produce pulque, an alcoholic beverage obtained through fermentation. However, a more efficient alternative is the production of a concentrate, known as agave syrup or maguey honey, which is obtained by exposing aguamiel to a thermal process to concentrate the sugars (de la Rosa et al., 2023; Martínez-Zavala et al., 2023).

To use aguamiel as a nutraceutical beverage or as raw material for agave syrup production, it is essential to preserve its physicochemical and functional properties, such as sugar concentration and bioactive compound content, during storage. However, the main challenge lies in minimizing the spontaneous fermentation process that occurs after aguamiel is collected, as its chemical composition promotes the growth of microorganisms. The primary microorganisms found in aguamiel include yeasts from the genera *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, and *Clavispora*, as well as bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Acetobacter*. These microorganisms contribute to the alcoholic, acidic, and viscous fermentation of aguamiel (Enríquez-Salazar et al., 2017), which negatively impacts its flavor and the yield of agave syrup production, ultimately hindering its potential for fresh commercialization. Thus, applying preservation methods during the transportation and storage of aguamiel is crucial to maintaining its properties.

To reduce or inhibit the spontaneous fermentation process, as well as minimize nutritional and functional losses, thermal treatments are commonly used to ensure the safety of products. However, these treatments can cause undesirable changes in color, flavor, and functionality, which has led to the exploration of emerging non-thermal technologies such as ozonation (García-Mateos et al., 2019).

Ozone is a highly effective oxidizing agent, and its antimicrobial capacity is due to the inactivation of microorganisms through the destruction of various cellular components, such as the cell wall and membrane (Pandiselvam et al., 2022). Furthermore, it has been reported that its application in food and beverages helps maintain organoleptic, nutritional, and functional quality. Zardzewiały et al. (2023) noted

## Introducción

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

Para poder aprovechar el aguamiel como bebida nutracéutica o como materia prima en la elaboración de jarabe de agave, es necesario conservar sus características fisicoquímicas y funcionales, como la concentración de azúcares y el contenido de compuestos bioactivos, durante el almacenamiento. No obstante, el principal reto es disminuir el proceso de fermentación espontáneo que sufre el aguamiel después de ser colectado, ya que su composición química favorece la proliferación de microorganismos. Entre los principales microorganismos reportados en aguamiel se encuentran levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y *Clavispora*, y bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*. Estos microorganismos participan en la fermentación alcohólica, ácida y viscosa del aguamiel (Enríquez-Salazar et al., 2017), y afectan el sabor y el rendimiento de la producción de jarabe de agave, lo cual compromete su posible comercialización en fresco. Por ello, la aplicación de métodos de conservación durante el transporte y almacenamiento del aguamiel es fundamental para preservar sus propiedades.

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

El ozono es un agente oxidante altamente efectivo, cuya capacidad antimicrobiana se debe a la inactivación de microorganismos mediante la destrucción de varios componentes celulares, como la pared y la membrana celular (Pandiselvam et al., 2022). Asimismo, se ha

that wheat beers enriched with rhubarb petioles (*Rheum rhabarbarum*) treated with ozone (50 ppm for 30 min) were more microbiologically stable than untreated beers. Gorzelany et al. (2024) observed that ozonation improved the microbiological stability of Japanese quince and beers supplemented with this treated fruit. Chauhan and Negi (2024) stated that ozone inhibits microbial growth in apple juice, and Wang et al. (2024) demonstrated ozone's potential to reduce the concentration of two *Alternaria* mycotoxins (alternariol and alternariol monomethyl) in orange juice without affecting its quality.

It is important to consider that the effectiveness of ozone in reducing microorganisms depends on various parameters, such as time, dosage, temperature, pressure, and relative humidity. Additionally, intrinsic factors of the food, such as pH, conductivity, and chemical composition, can influence the effectiveness of the treatment (Epelle et al., 2023). This highlights the need to continue studying the application of ozone in highly perishable products, such as aguamiel. To date, there is no information available on the impact of ozone on aguamiel during different storage stages prior to processing. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of ozone application and re-ozonation on the microbiological stability, physicochemical properties (pH, total soluble solids [TSS], and titratable acidity [TA]), ethanol production (% v/v), and nutraceutical quality (total soluble phenolic compounds [TSPC] and antioxidant activity [AA]) in *A. salmiana* aguamiel.

## Materials and methods

Aguamiel used in the research was obtained from pulque maguey plants (*A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck cultivar Ayoteco) in Coatepec, Estado de México, during May 2021. Aguamiel was collected during 5 days in the morning from plants in intermediate production. The experimental unit consisted of 100 mL of aguamiel extracted from a composite sample of 1 L, with the collection day being established as a blocking factor.

The aguamiel was placed in glass bottles, previously sterilized, for preservation and transported at approximately 2 °C using dry ice. The estimated transportation time to the analysis site was 1 hour

### Ozone application

Aguamiel ozonation was carried out using a semi-industrial ozone generator (PTA mini, Biozon, Mexico) with a fixed injection rate of 1.2 g·h<sup>-1</sup>. Based on previous studies (García-Mateos et al., 2019), preliminary exposure times to ozone in aguamiel were evaluated. The results obtained, along with the interest in preserving the nutraceutical quality of the aguamiel,

reportado que su aplicación en alimentos y bebidas mantiene la calidad organoléptica, nutricional y funcional. Zardzewiały et al. (2023) mencionan que las cervezas de trigo enriquecidas con peciolos de ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) tratados con ozono (50 ppm por 30 min) fueron más estable, desde el punto de vista microbiológico, que las cervezas sin tratamiento. Gorzelany et al. (2024) observaron que la ozonización mejoró la estabilidad microbiológica del membrillo japonés y de las cervezas adicionadas con este fruto tratado. Chauhan y Negi (2024) afirman que el ozono inhibe el crecimiento microbiano en zumo de manzana, y Wang et al. (2024) demostraron el potencial del ozono para reducir la concentración de dos micotoxinas de *Alternaria* (alternariol y alternariol monometil) en jugo de naranja sin afectar su calidad.

Es importante considerar que la eficacia del ozono en la reducción de microorganismos depende de diversos parámetros, como el tiempo, la dosis, la temperatura, la presión y la humedad relativa. Además, factores intrínsecos del alimento como el pH, la conductividad y la composición química pueden influir en la efectividad del tratamiento (Epelle et al., 2023). Lo anterior resalta la necesidad de continuar estudiando la aplicación de ozono en productos altamente perecederos, tal es el caso del aguamiel. Hasta el momento, no se cuenta con información sobre el impacto del ozono en aguamiel durante diferentes etapas de almacenamiento previas a su procesamiento. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de ozono y reozonización sobre la estabilidad microbiológica, fisicoquímica (pH, sólidos solubles totales [SST] y acidez titulable [AT]), producción de etanol (% v/v) y calidad nutracéutica (compuestos fenólicos solubles totales [CFST] y actividad antioxidante [AA]) en aguamiel de *A. salmiana*.

## Materiales y métodos

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

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

### Aplicación de ozono

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

led to the selection of short exposure times (6 and 12 minutes of ozone) plus the control (0 minutes), because ozone, due to its oxidative capacity, can degrade phytochemicals (Tiwari et al., 2013).

The experimental units of aguamiel were placed in 300 mL glass cylinders to prevent spills. Ozone injection was performed using a perforated polypropylene hose, which was inserted into the glass cylinder to increase the contact of ozone with the sample.

#### Microorganism population count in aguamiel

The total microbial population (TMP) count was carried out in a Neubauer chamber. For this, 1 mL of violet crystal was diluted in 9 mL of sterilized water. Then, 0.5 mL of the sample was mixed with 0.5 mL of the previously diluted violet crystal. The count was performed using an optical microscope at 100× magnification in five quadrants, and the average was calculated. TMP was estimated using the following equation:

$$TMP = (\bar{Y})(FD)(2)(10\,000)$$

where  $\bar{Y}$  is the average of five quadrants,  $FD$  is the dilution factor of the sample, 2 is the dilution factor for the stain, and 10 000 corresponds to the conversion factor from 0.1  $\mu\text{L}$  to 1 mL (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

The total yeast count (TYC) was performed following the methodology established by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012) using YM 3M™ Petrifilm™ plates. Furthermore, the quantification of lactic acid bacteria was conducted on MRS agar (Sigma-Aldrich, EUA).

#### Physicochemical variables

The physicochemical variables evaluated were TSS, TA, pH, and ethanol concentration. TSS was determined using a portable digital refractometer (PAL-1®, ATAGO®, USA), and data was expressed in °Brix. TA was quantified by volumetric analysis and expressed as g of lactic acid per L of aguamiel. The pH was measured with a potentiometer (H1-2221, Hanna Piccolo®, USA). The last two variables were analyzed according to the methods described by AOAC (2005).

Ethanol concentration was quantified using the headspace technique described by Davis and Chace (1969). For this, 5 mL of aguamiel was placed in a 26 mL glass container, which was hermetically sealed. Then, using a 1 mL syringe, the air from the headspace was extracted and injected into a gas chromatograph (7890a, Agilent Technologies®, USA) equipped with a capillary column (Varian Star 3400, USA), a thermal conductivity

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

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

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

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

$$PTM = (\bar{Y})(FD)(2)(10\,000)$$

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

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

#### Variables fisicoquímicas

Las variables fisicoquímicas evaluadas fueron: SST, AT, pH y concentración de etanol. Los SST se determinaron en un refractómetro digital portátil (PAL-1®, ATAGO®, EUA) y los datos se expresaron en °Brix. La AT se cuantificó por volumetría y se expresó como g de ácido láctico por L de aguamiel. El pH se midió con un potenciómetro (H1-2221, Hanna Piccolo®, EUA). Las últimas dos variables se analizaron de acuerdo con los métodos descrito por la AOAC (2005).

La concentración de etanol se cuantificó mediante la técnica de espacio de cabeza descrita por Davis y Chace (1969). Para ello, se colocaron 5 mL de aguamiel en un

detector (TCD), and a flame ionization detector (FID). Helium was used as the carrier gas. Before analysis, an ethanol standard of known concentration was injected to obtain the calibration curve. The results were expressed as a percentage of ethanol (v/v).

### Nutraceutical variables

#### *Extract preparation*

Aguamiel was dissolved in 80 % (v/v) aqueous methanol to obtain an extract concentration of 30 % (v/v). The mixture was homogenized using a vortexer (Maxi-Mix II, M63215, Thermolyne, USA) and incubated at 4 °C for 24 h. Subsequently, the extract was centrifuged (YV-17414-21, Cole-Parmer®, USA) at 2598 × g for 5 min to separate the supernatant and remove insoluble solids that could interfere with phytochemical quantification. This methanolic extract was used to determine the TSPC content and the AA in aguamiel.

#### *Quantification of total soluble phenolic compounds*

This determination was performed using the Folin-Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965). For this, 0.2 mL of methanolic extract was mixed with 2 mL of water and 0.2 mL of Folin-Ciocalteu reagent (2 N, Sigma-Aldrich) and allowed to rest for 3 min. Then, 0.8 mL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5 % w/v) was added, and the mixture was left in the dark at room temperature for 1 h. Finally, absorbance was measured at 760 nm using a spectrophotometer (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, USA). Quantification was performed using a standard curve of gallic acid:  $y = 5.9982x - 0.0025$ ;  $R^2 = 0.992$ . The results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 mL of aguamiel ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

#### *Determination of antioxidant activity*

**ABTS\*\* Assay.** The antioxidant capacity based on ABTS\*\* radical scavenging was determined according to the method described by Miller and Rice-Evans (1996), with some modifications. First, a 7 mM ABTS\*\* solution was prepared in distilled water, along with a 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> solution, and both were mixed in a 1:1 ratio. The resulting solution was left in the dark for 16 h and then diluted with anhydrous ethanol until an absorbance of  $0.7 \pm 0.01$  at 734 nm was obtained. An 80 % (v/v) aqueous methanol solution was used as a blank. Separately, 2000 µL of the ABTS\*\* solution was mixed with 20 µL of the sample extract and allowed to react in the dark at room temperature for 30 minutes. The absorbance of the mixture was then measured at 734 nm using a spectrophotometer (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, USA). Antioxidant activity (AA) was quantified using a Trolox standard curve:  $y = 41.721x + 3.9051$ ;  $R^2 = 0.991$ , and the results were

vial de vidrio de 26 mL, el cual se selló herméticamente. Después, con una jeringa de 1 mL, se extrajo el aire del espacio de cabeza y se inyectó en un cromatógrafo de gases (7890a, Agilent Technologies®, EUA) equipado con una columna capilar (Varian Star 3400, EUA), un detector de conductividad térmica (TCD) y un detector de ionización de llama (FID). Se utilizó helio como gas portador. Previamente al análisis, se inyectó un estándar de etanol de concentración conocida para obtener la curva de calibración. Los resultados se expresaron como porcentaje de etanol (v/v).

### Variables nutraceuticas

#### *Preparación del extracto*

El aguamiel se disolvió en metanol acuoso a 80 % (v/v) para obtener una concentración del extracto al 30 % (v/v). La mezcla se homogeneizó en un vortex (Maxi-Mix II, M63215, Thermolyne, EUA) y se incubó a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, el extracto se centrifugó (YV-17414-21, Cole-Parmer®, EUA) a 2598 × g por 5 min para separar el sobrenadante y eliminar los sólidos no solubles que pudieran interferir en la cuantificación fitoquímica. Este extracto metanólico se utilizó para determinar el contenido de CFST y la AA en el aguamiel.

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

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

#### *Determinación de la actividad antioxidante*

**Ensayo ABTS\*\*.** La capacidad antioxidante mediante la captación del radical ABTS\*\* se determinó de acuerdo con el método descrito por Miller y Rice-Evans (1996), con algunas modificaciones. Primero, se preparó una solución 7 mM de ABTS\*\* en agua destilada y otra de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> a 2.45 mM, y se mezclaron en una relación 1:1. La solución resultante se dejó reposar en oscuridad por 16 h y después se diluyó con etanol anhidro hasta obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.01$  a 734 nm. Se utilizó metanol acuoso al 80 % (v/v) como blanco. Por otra parte, se mezclaron 2000 µL de la solución ABTS\*\*

expressed as micromoles of Trolox equivalents per 100 mL of fresh-weight aguamiel ( $\mu\text{M}_{\text{TE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

**FRAP Assay.** Antioxidant activity using the FRAP assay was conducted following the methodology proposed by Benzie and Strain (1996). To prepare the FRAP reagent, an acetate buffer solution (300 mM, pH 3.6), a ferric-2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) solution (10 mM in 40 mM HCl), and  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) were mixed in a 10:1:1 ratio. Subsequently, 3 mL of the FRAP reagent, 300  $\mu\text{L}$  of distilled water, and 100  $\mu\text{L}$  of methanolic extract were combined. The mixture was incubated in a water bath at 37 °C for 30 min, and absorbance was measured at 593 nm using a spectrophotometer (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, USA). AA was quantified using a Trolox standard curve:  $y = 0.0012x - 0.0269$ ;  $R^2 = 0.9965$ . Results were expressed as micromoles of Trolox equivalents per 100 mL of fresh-weight aguamiel ( $\mu\text{M}_{\text{TE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

### Statistical analysis

The experiment was conducted using a randomized complete block design with a  $3 \times 4$  factorial structure. Due to the nature of the study, the experimental design was analyzed using a mixed-effects model (Zhao, 2019), which leads to more robust results and a higher degree of generalization in the conclusions. The evaluated levels included three ozone application times (0, 6, and 12 min) and four storage times (0, 12, 24, and 48 h). The blocking factor was the collection period of the experimental material due to the variability of aguamiel between harvest days. This structure resulted in twelve treatments, each with five replicates.

In the mixed-effects model, the blocking factor was treated as a random effect, whereas ozone application time, storage time, and interaction were considered fixed effects. All results were expressed as mean  $\pm$  standard error, and Tukey–Kramer’s multiple comparison test ( $\alpha = 0.05$ ) was applied. Statistical analysis was performed using SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

### Results and discussion

One of the main challenges in the agave syrup production industry is reducing or preventing the fermentation of aguamiel during its transportation to the processing facility. Aguamiel harbors a microbial consortium, making it highly susceptible to fermentation within short periods. Therefore, it is crucial to use appropriate quantification methods to determine the concentration of microorganisms in a specific volume and time.

From a technical perspective, the use of a Neubauer chamber is a viable option for microbial count, as it

con 20  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra y se dejó reaccionar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la mezcla a 734 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s, Thermo Fisher Scientific, EUA). La AA se cuantificó a partir de una curva estándar de trolox:  $y = 41.721x + 3.9051$ ;  $R^2 = 0.991$ , y los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de trolox por 100 mL de aguamiel en peso fresco ( $\mu\text{M}_{\text{ET}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ).

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

### Análisis estadístico

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

En el modelo mixto, el factor bloques se trató como un efecto aleatorio, mientras que el tiempo de ozono, tiempo de almacenamiento y su interacción se consideraron efectos fijos. Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar, y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey–Kramer ( $\alpha = 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó en el programa SAS ver. 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

### Resultados y discusión

Uno de los principales retos de la industria de producción de jarabe de agave es disminuir o evitar la fermentación del aguamiel durante su traslado a la

is a fast and direct method to know the morphology of the microorganisms present. By complementing these results with morphological and structural descriptions available in the literature, it is possible to infer the types of microorganisms present in aguamiel. However, seeding on selective culture media is necessary to confirm microbial identity. In this study, the aforementioned approach was applied for the identification of microorganisms (Figure 1).

### Total microbial population

According to the morphological characteristics observed, microorganisms of bacilli and yeast groups were identified (Figure 1). The presence of bacilli is mainly associated with lactic acid bacteria (LAB), where the genus *Leuconostoc* stands out, characterized by short bacilli arranged in a chain (Rao et al., 2023).

Torres-Rodríguez et al. (2014) reported a high abundance of LAB in traditional fermented beverages and identified *Leuconostoc mesenteroides* in agave sap, considered one of the most important LAB in the fermentation process of aguamiel. On the other hand, Enríquez-Salazar et al. (2017) identified various genera of LAB and yeasts with potential industrial applications, such as *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Clavispora*.

In the present study, it was observed that during the first 24 hours of storage, TMP in the control group was statistically higher ( $p < 0.05$ ) than in the ozone treatments (Figure 2). Between 12 and 24 h, no

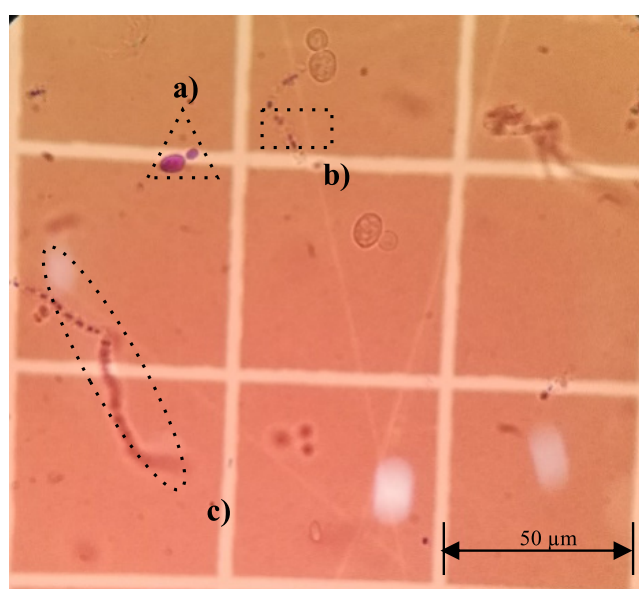
unidad de proceso. El aguamiel alberga un consorcio de microorganismos que lo hace susceptible a procesos de fermentación en periodos cortos. Por ello, es importante empelar métodos de cuantificación adecuados que permita determinar la concentración de microorganismos en un volumen y tiempo específicos.

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

### Población total de microorganismos

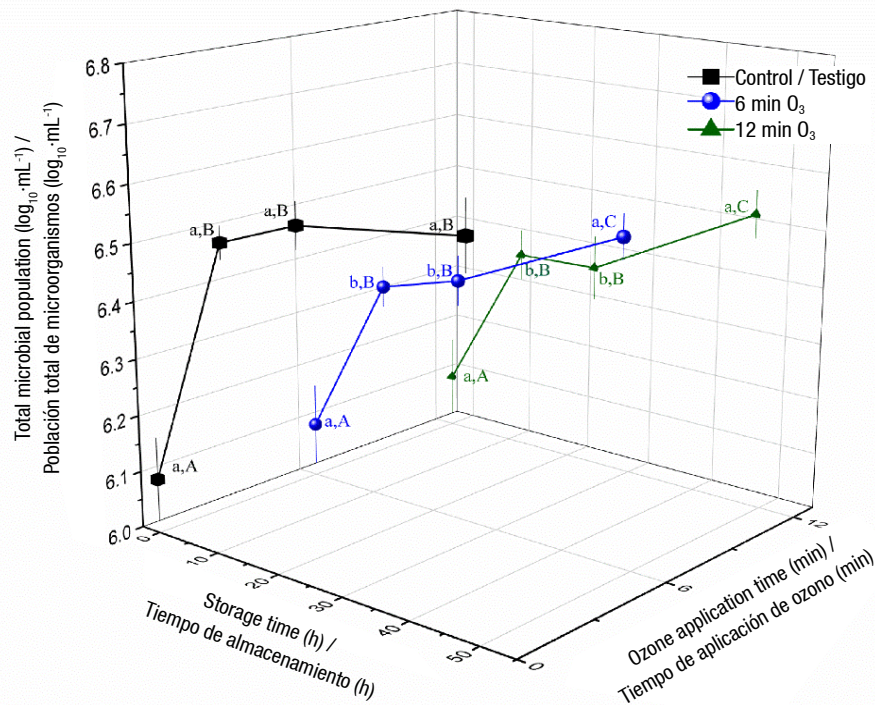
De acuerdo con las características morfológicas observadas, se identificaron microorganismos de los grupos bacilos y levaduras (Figura 1). La presencia de bacilos se asocia principalmente con bacterias ácido-lácticas (BAL), donde destaca el género *Leuconostoc*, caracterizado por bacilos cortos dispuestos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

Torres-Rodríguez et al. (2014) reportaron una gran abundancia de BAL en bebidas fermentadas



**Figure 1. Visualization of microorganisms in the Neubauer chamber with 100× optical microscope: a) yeasts, b) lactic acid bacteria and c) *Leuconostoc*.**

**Figura 1. Visualización de microorganismos en la cámara Neubauer con microscopio óptico 100×: a) levaduras, b) bacterias ácido-lácticas y c) *Leuconostoc*.**



**Figure 2.** Total microbial population ( $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in aguamiel from *A. salmiana* treated with different ozone application times (0, 6, and 12 min) in different storage periods at room temperature (0, 12, 24, and 48 h). Lowercase letters correspond to the ozone application time (min) within each storage time, while uppercase letters correspond to the storage time (h) within each ozone application time. Different letters indicate statistically significant differences (Tukey - Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

**Figura 2.** Población total de microorganismos ( $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en aguamiel de *A. salmiana* tratado con diferentes tiempos de aplicación de ozono (0, 6 y 12 min) en distintos periodos de almacenamiento a temperatura ambiente (0, 12, 24 y 48 h). Letras minúsculas corresponden al tiempo de aplicación de ozono (min) dentro de cada tiempo de almacenamiento, y letras mayúsculas corresponden al tiempo de almacenamiento (h) dentro de cada tiempo de aplicación de ozono. Letras distintas indican diferencias estadísticas (Tukey - Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

significant increase in microorganisms in aguamiel was observed, with an average of 6.56 and 6.39  $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$  in the control group and ozone-treated samples (6 and 12 min), respectively. After 48 hours of storage, the effect of ozone ceased to be significant, with an average TMP of 6.57  $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$  in all three treatments.

### Viable cells

Once TMP was quantified, the presence of viable LAB and TY was determined by counting colony forming units (CFU) on selective culture media. These tests were conducted only on samples stored for 24 and 48 h, with 0 and 12 min of ozone exposure (Table 1). Statistical analysis revealed a significant interaction ( $p < 0.05$ ) between these variables. The treatment with 12 min of ozone application at 24 h resulted in a significantly lower count compared to the treatment without ozone at 48 h of storage, for both LAB and TY counts.

tradicionales, e identificaron a *Leuconostoc mesenteroides* en la savia de agave, considerada como una de las BAL más importante en el proceso de fermentación del aguamiel. Por otro lado, Enríquez-Salazar et al. (2017) identificaron diferentes géneros de BAL y levaduras con posibles aplicaciones industriales, como *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Clavispora*.

En el presente estudio, se observó que durante las primeras 24 h de almacenamiento la PTM en el testigo fue estadísticamente superior ( $p < 0.05$ ) a los tratamientos con ozono (Figura 2). Entre las 12 y 24 h, no se observó un aumento significativo de microorganismos en aguamiel, al registrarse un promedio de 6.56 y 6.39  $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el testigo y con la aplicación de ozono (6 y 12 min), respectivamente. A partir de las 48 h de almacenamiento, el efecto del ozono dejó de ser significativo, con una PTM promedio de 6.57  $\log_{10}\cdot\text{mL}^{-1}$  en los tres tratamientos.

**Table 1. Total microbial population: lactic acid bacteria (LAB) and total yeasts (TY) in aguamiel treated with different ozone exposure times.****Cuadro 1. Población total de microorganismos: bacterias ácido-lácticas (BAL) y levaduras totales (LT) en aguamiel tratado con diferentes tiempos de exposición a ozono.**

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

Means with different letters indicate statistical differences (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ) between treatments based on the interaction between storage time and ozone exposure time.

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

Temperature was likely a factor influencing microbial growth during the first 48 hours, as the samples were maintained at  $25.44 \pm 1.18$  °C. It has been reported that microbial growth is affected by storage temperature. LAB show optimal growth between 28 and 37 °C, while yeasts can develop between 10 and 50 °C, with optimal growth occurring between 20 and 35 °C (Lin et al., 2012; Velázquez-López et al., 2018). Therefore, future research should evaluate the synergistic effect of ozone and refrigeration.

### Physicochemical characterization

The parameters of TA, pH, and TSS are closely related to the results presented in Table 1, as LAB and TY are the primary agents responsible for fermentation, a process that affects the quality of aguamiel.

#### Titrate acidity

The presence of LAB in aguamiel allows for the quantification of lactic acid (one of the main metabolites of LAB) as an indicator of the fermentation process onset. The effect of ozone on lactic acid production in aguamiel remained consistent with storage times (Figure 3a), with no significant differences ( $p < 0.05$ ) between ozone application levels (lowercase letters). This may be related to the significant increase in viable cells responsible for lactic acid production. On the other hand, storage time had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on lactic acid production, with an average increase from 0.06 to 1.04 g·L<sup>-1</sup> after 48 h. This increase can be attributed to LAB activity, as they primarily produce lactic acid as the final product of sugar fermentation (Ojo & de Smidt, 2023). In aguamiel, it has been observed that during acidic fermentation, important metabolites such as lactic acid are generated, mainly by *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. (Escalante et al., 2016).

### Células viables

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

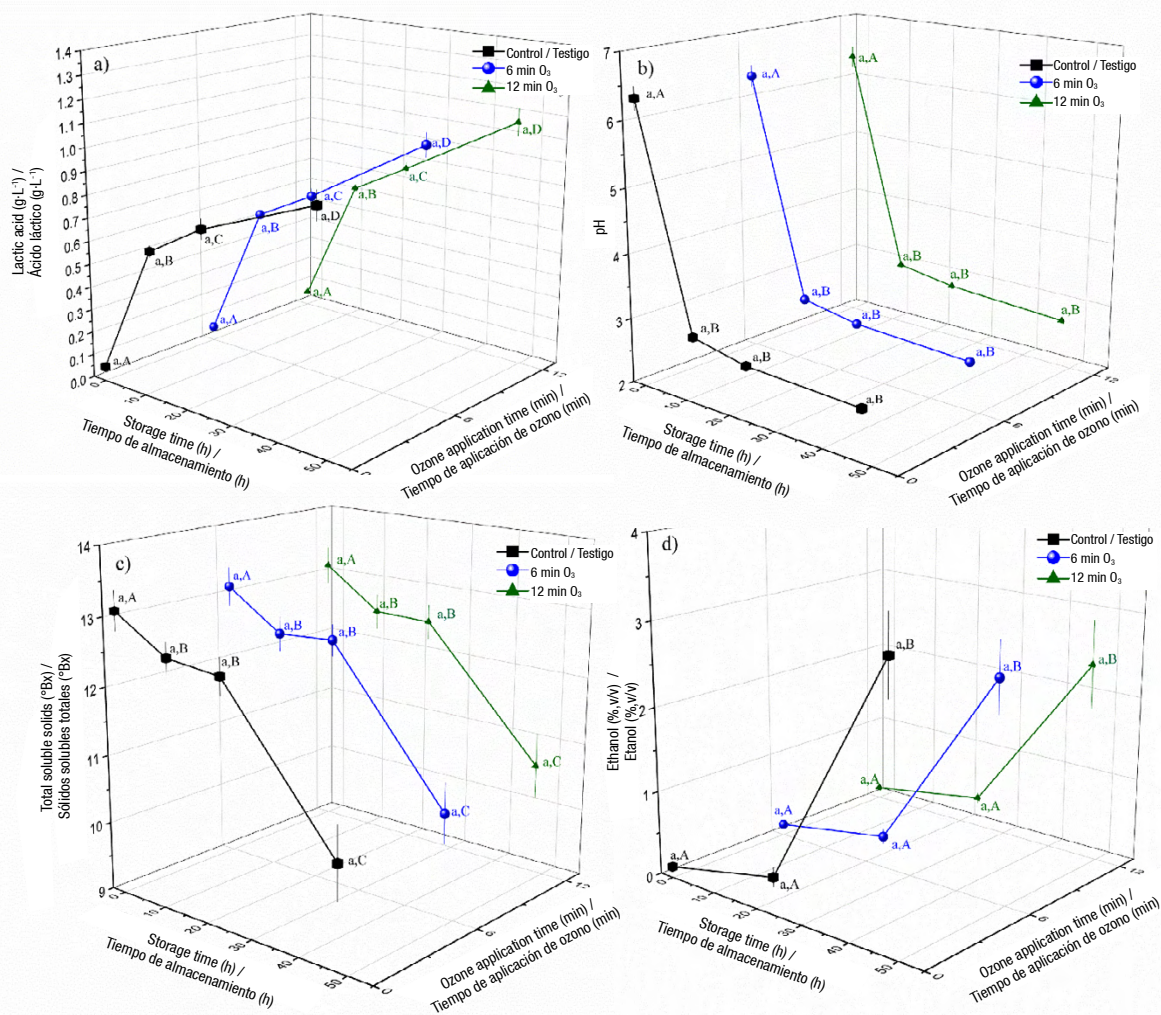
La temperatura fue un factor que probablemente influyó en el crecimiento de los microorganismos durante las primeras 48 h, ya que las muestras se encontraban a  $25.44 \pm 1.18$  °C. Se ha reportado que el crecimiento microbiano está influenciado por la temperatura de almacenamiento. En particular, las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

### Caracterización fisicoquímica

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

#### Acidez titulable

La presencia de BAL en el aguamiel permite considerar la cuantificación de ácido láctico (uno de los principales



**Figure 3.** Physicochemical characteristics of *A. salmiana* aguamiel treated with different ozone application times (0, 6, and 12 min) and stored at room temperature for different periods (0, 12, 24, and 48 h): a) titratable acidity, b) pH, c) total soluble solids, and d) ethanol concentration. Lowercase letters correspond to the ozone application time (min) within each storage time, while uppercase letters correspond to the storage time (h) within each ozone application time. Different letters indicate statistically significant differences (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

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

### pH

The ozone application time had no significant effect on the aguamiel pH; however, the storage period did have a significant influence ( $p < 0.05$ ). A drastic decrease in pH was observed during the first 12 hours of storage, dropping from an average of 6.36 to 2.99 (Figure 3b). Acidification in fermentation systems may be related to the production of organic acids (Contreras-López et al., 2023), which agrees with the increase observed in lactic acid in aguamiel (Figure 3a).

metabolitos de las BAL) como un indicador del inicio del proceso de fermentación. El efecto del ozono sobre la producción de ácido láctico en aguamiel fue consistente dentro de los tiempos de almacenamiento (Figura 3a), sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes niveles de su aplicación (letras minúsculas). Esto puede estar relacionado con el incremento significativo de células viables responsables de la producción de ácido láctico. Por otra parte, el tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la producción de ácido láctico, al registrarse un

### Total soluble solids

TSS provide information about the content of sugars, organic acids, and inorganic compounds. Figure 3c shows that ozone application times have no significant effect on TSS ( $p < 0.05$ , lowercase letters). However, TSS concentration significantly decreased after 48 hours of storage ( $p < 0.05$ ). This behavior can be attributed to the transformation of sugars into ethanol and exopolysaccharides by yeast and bacterial activity during fermentation (García-Arce & Castro-Muñoz, 2021).

### Ethanol concentration

Due to the non-significant changes in pH and TSS between 12 and 24 h, ethanol quantification was performed only at 0, 24, and 48 h of storage. In this regard, a low ethanol concentration was observed during the first 24 h of storage, with ethanol production ranging from 0.13 % to 0.40 % (v/v) (Figure 3d). However, ethanol production showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) at 48 h. Similar to other variables, ozone application time showed no effect ( $p < 0.05$ ) on ethanol production, as all treatments had a similar increase after 48 hours of storage. Although the control treatment reached the highest ethanol concentration (3.18 % v/v), this was not statistically different from the ozone-treated samples, suggesting that the ozone application failed to slow down the fermentation process under the evaluated conditions.

Despite the increase in ethanol concentration, the values obtained were lower than those reported by Cervantes-Contreras and Pedroza-Rodríguez (2007) for the different fermentation stages of aguamiel during pulque production. Their study reported ethanol concentrations ranging from 7.01 % to 7.03 % (v/v) of ethanol in seed (pulque fermented for 60 days), 6.25 % to 6.34 % in the *contrapunta* (pulque fermented for 24 h, a 1:1 mixture of aguamiel and seed), and up to 10.35 % in *corrida* (pulque fermented for 48 h, the final stage). Ethanol production is closely related to the activity of yeasts from the *Saccharomyces* genus, which are recognized for their predominant role in the alcoholic fermentation of traditional beverages such as pulque (Rocha-Arriaga & Cruz-Ramírez, 2022). The persistence of these yeasts could explain the observed ethanol increase, even in ozone-treated samples.

### Nutraceutical quality

#### Antioxidant activity (AA)

The AA determined using the ABTS<sup>••</sup> assay was affected by different ozone application times (Figure 4a). After 24 h of storage, the application of ozone for 12 min reduced AA by 22.9 % compared to the control (0 min

aumento promedio de 0.06 a 1.04 g·L<sup>-1</sup> después de 48 h. Este aumento se puede atribuir a la actividad de las BAL, conocidas por producir principalmente ácido láctico como producto final de la fermentación de azúcares (Ojo & de Smidt, 2023). En aguamiel se ha observado que durante la fermentación ácida se generan algunos metabolitos importantes, como el ácido láctico, que es producido por *Lactobacillus* sp. y *Leuconostoc* sp. (Escalante et al., 2016).

#### pH

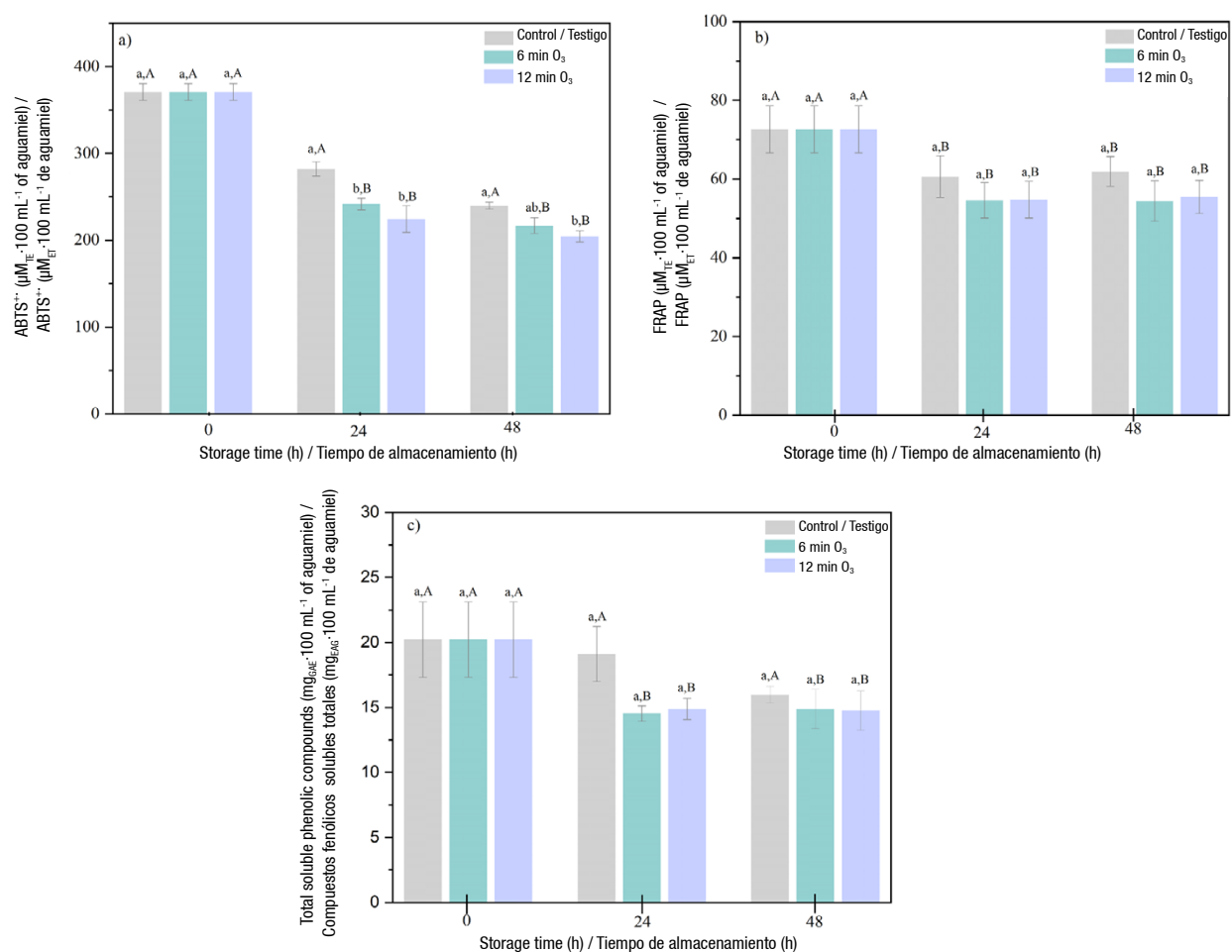
El tiempo de aplicación de ozono no tuvo un efecto significativo sobre el pH del aguamiel; sin embargo, el tiempo de almacenamiento sí influyó de manera significativa ( $p < 0.05$ ). Se observó una disminución drástica del pH durante las primeras 12 h de almacenamiento, al pasar de 6.36 a 2.99 en promedio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

#### Sólidos solubles totales

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

#### Concentración de etanol

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



**Figure 4.** Antioxidant activity determined by the ABTS\*\* (a) and FRAP (b) methods, and total soluble phenolic compounds concentration (c) in *A. salmiana* aguamiel treated with different ozone application times (0, 6, and 12 min) and stored at room temperature for different periods (0, 24, and 48 h). Lowercase letters correspond to the ozone application time (min) within each storage period, while uppercase letters correspond to the storage period (h) within each ozone application time. Different letters indicate statistically significant differences (Tukey – Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

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

of ozone) (Figure 4a). These results are similar to those reported by Panigrahi et al. (2020), who observed a 30 % reduction in AA when treating sugarcane juice with ozone at a concentration of 26.4 %. In contrast, the analysis using the FRAP method (Figure 4b) showed no significant differences ( $p < 0.05$ ) in AA due to ozone exposure during the 48 h of storage, with average values ranging from 54.42 to 72.64  $\mu\text{M}_{\text{TE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ . The difference between the two methods could be attributed to the sensitivity of the ABTS\*\* assay, which is known for its ability to detect a broad range of antioxidant compounds in both hydrophilic and

lipophilic (Figure 4a). Despite the increase in ethanol concentration, the values obtained are lower than those reported by Cervantes-Contreras and Pedroza-Rodríguez (2007) in the different stages of fermentation of aguamiel for the obtention of pulque, with values of 7.01 to 7.03 % (v/v) of ethanol in the seed (pulque with 60 days of fermentation), 6.25 to 6.34 % in the counterpoint (pulque with 24 h of fermentation, 1:1 mixture of aguamiel and seed), and up to 10.35 % of ethanol in the run (pulque with 48 h of fermentation, final stage). The production of ethanol is closely related to the activity of yeasts of the genus *Saccharomyces*, recognized for

lipophilic matrices (Munteanu & Apetrei, 2021). This characteristic could explain the detection of ozone effects in the ABTS<sup>\*\*</sup> assay compared to the FRAP assay.

On the other hand, AA gradually decreased in all experimental units after 48 h of storage, with no statistical differences between the ozone application times (Figures 4a,b).

#### *Total soluble phenolic compounds*

Ozone application had no significant effect ( $p < 0.05$ ) on the content of TSPC in aguamiel (Figure 4c), suggesting that ozone can be applied to aguamiel without affecting its nutraceutical properties. This finding agrees with previous studies indicating that the impact of ozone on liquids is usually minimal compared to other technologies. Panigrahi et al. (2020) observed a slight decrease (13.5 %) in TSPC content in ozone-treated sugarcane juice, while Ari et al. (2020) reported that ozone application helped preserve the quality characteristics of apple juice, including TSPC content.

On the other hand, the storage time significantly affected ( $p < 0.05$ ) the content of TSPC in the ozone treatments (Figure 4c). This could be attributed to the autooxidation of TSPC in the presence of oxygen, polyphenol oxidases, and peroxidases (Zhang et al., 2022). Furthermore, significant changes in the physicochemical properties of aguamiel were detected starting at 24 h (Figure 3), which could indicate the beginning of the fermentation process, which may have affected the reduction of TSPC. Melini and Melini (2021) suggest that the decrease in TSPC could be due to degradation or hydrolysis caused by enzymes and microorganisms.

#### *Re-ozonation*

After 48 h of storage, ozone was reintroduced into the experimental units of the six treatments. Table 2 shows the results of the eight variables evaluated, and no significant interaction between the factors was observed. The comparisons made contrast the levels of one factor within each level of the second factor.

Re-ozonation showed no significant effect ( $p < 0.05$ , lowercase letters) on TMP, TA, pH, TSS, ethanol concentration, or TSPC during the 48 to 72 h period (Table 2). This can be attributed to the influence of various factors on ozone efficiency, such as the pH of the medium, temperature, humidity, concentration, and contact time, sample composition, type of microorganisms, and their physiological state, among others (Kim et al., 2003; Xue et al., 2023). In this regard, since the aguamiel samples had an acidic pH (2.64 - 2.78), the effectiveness of the ozone was negatively

su papel predominante en la fermentación alcohólica de bebidas tradicionales como el pulque (Rocha-Arriaga & Cruz-Ramírez, 2022). La persistencia de estas levaduras podría explicar el aumento de etanol observado, incluso en las muestras tratadas con ozono.

#### *Calidad nutracéutica*

##### *Actividad antioxidante (AA)*

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

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

##### *Compuestos fenólicos solubles totales*

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

Por otro lado, el tiempo de almacenamiento afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de CFST en los tratamientos con ozono (Figura 4c). Esto se podría atribuir a la autooxidación que sufren los CFST en presencia de oxígeno, polifenol oxidases y peroxidases (Zhang et al., 2022). Además, a partir de las 24 h se

**Table 2. Physicochemical characteristics of re-ozonation in aguamiel with different ozone exposure times at two storage periods.****Cuadro 2. Características físicoquímicas del aguamiel reozonizado con diferentes tiempos de exposición a ozono en dos tiempos de almacenamiento.**

| Variables/<br>Variables  | Time (h)/<br>Tiempo (h) | Ozone exposure time (min)/<br>Tiempo de exposición a ozono (min) |                   |                   |
|--|-------------------------|--|-------------------|-------------------|
|  |                         | 0  | 6                 | 12                |
| TMP ( $\log_{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) /<br>PTM ( $\log_{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ )   | 48                      | 6.63 ± 0.05 aA   | 6.56 ± 0.03 aA    | 6.52 ± 0.04 aA    |
|  | 72                      | 6.68 ± 0.04 aB   | 6.62 ± 0.03 aB    | 6.59 ± 0.02 aB    |
| TA ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) /<br>AT ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )   | 48                      | 0.98 ± 0.05 aA   | 1.09 ± 0.05 aA    | 1.07 ± 0.05 aA    |
|  | 72                      | 1.22 ± 0.06 aB   | 1.20 ± 0.06 aA    | 1.23 ± 0.09 aB    |
| pH   | 48                      | 2.78 ± 0.04 aA   | 2.74 ± 0.05 aA    | 2.73 ± 0.04 aA    |
|  | 72                      | 2.64 ± 0.03 aB   | 2.68 ± 0.04 aA    | 2.69 ± 0.03 aA    |
| TSS (°Brix) /<br>SST (°Brix)   | 48                      | 10.48 ± 0.52 aA  | 10.52 ± 0.43 aA   | 10.64 ± 0.46 aA   |
|  | 72                      | 8.06 ± 0.22 aB   | 8.12 ± 0.28 aB    | 8.60 ± 0.58 aB    |
| Ethanol (% v/v) /<br>Etanol (% v/v)  | 48                      | 3.18 ± 0.44 aA   | 2.59 ± 0.42 aA    | 2.37 ± 0.52 aA    |
|  | 72                      | 5.95 ± 0.60 aB   | 5.71 ± 0.69 aB    | 4.75 ± 0.70 aB    |
| TSPC ( $\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) /<br>CFST ( $\text{mg}_{\text{EAG}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ )                     | 48                      | 15.99 ± 0.64 aA  | 14.89 ± 1.52 aA   | 14.77 ± 1.50 aA   |
|  | 72                      | 15.22 ± 0.48 aA  | 12.98 ± 1.31 aB   | 12.17 ± 1.50 aB   |
| AA per ABTS** ( $\mu\text{M}_{\text{TE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) /<br>AA por ABTS** ( $\mu\text{M}_{\text{ET}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) | 48                      | 239.81 ± 3.91 aA   | 216.71 ± 8.94 aA  | 204.37 ± 6.31 aA  |
|  | 72                      | 242.26 ± 14.69 aA  | 185.88 ± 11.18 aB | 158.99 ± 15.33 aB |
| AA per FRAP ( $\mu\text{M}_{\text{TE}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) /<br>AA por FRAP ( $\mu\text{M}_{\text{ET}} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ )     | 48                      | 61.94 ± 3.78 aA  | 54.42 ± 5.10 aA   | 55.49 ± 4.18 aA   |
|  | 72                      | 58.17 ± 6.13 aA  | 42.31 ± 2.72 aB   | 38.03 ± 4.75 aB   |

TMP: total microbial population; AT: titratable acidity; TSS: total soluble solids; AA: antioxidant activity; TSPC: total soluble phenolic compounds; ABTS\*\*: ABTS\*\* free radical antioxidant activity quantification method; FRAP: ferric reducing antioxidant power method. Means followed by lowercase letters correspond to the ozone application time for each storage period within each variable, and uppercase letters correspond to the storage period for each ozone application time within each variable. Different letters indicate statistical differences (Tukey - Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

PTM: población total de microorganismos; AT: acidez titulable; SST: sólidos solubles totales; AA: actividad antioxidante; CFST: compuestos fenólicos solubles totales; ABTS\*\*: método de cuantificación de actividad antioxidante por radical libre ABTS\*\*; FRAP: método de cuantificación de actividad antioxidante por poder antioxidante reductor del hierro. Medias seguidas por letras minúsculas corresponden al tiempo de aplicación de ozono para cada tiempo de almacenamiento dentro de cada variable, y letras mayúsculas corresponden al tiempo de almacenamiento para cada tiempo de aplicación de ozono dentro de cada variable. Letras distintas indican diferencias estadísticas (Tukey - Kramer,  $\alpha = 0.05$ ).

affected. In particular, the acidic pH of aguamiel (2.64 - 2.78) reduced the ozone's effectiveness, because its oxidative capacity is greater in basic environments due to the formation of hydroxyl radicals, whose oxidation potential exceeds 2.80 V (Panigrahi et al., 2020).

The storage time (48 h vs. 72 h) had a significant effect ( $p < 0.05$ , uppercase letters), reducing the values of the nutraceutical and physicochemical variables, except for TA and TMP, which showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) from 48 to 72 h in the treatment with 12 min of ozone exposure.

pH is a critical factor in ozone reactivity. In acidic media, its efficiency is limited due to the lower generation of hydroxyl radicals, whereas in alkaline conditions, the formation of reactive species (such as hydroxyls, hydroperoxides, and superoxides) enhances its oxidative action, which facilitates the disintegration of microbial cell walls due to oxidative

detectaron cambios significativos en las propiedades físicoquímicas del aguamiel (Figura 3), lo que podría indicar el inicio del proceso de fermentación, el cual pudo tener un efecto sobre la reducción de los CFST. Melini y Melini (2021) mencionan que la disminución de los CFST se puede deber a su degradación o hidrólisis provocada por enzimas y microorganismos.

### Reozonización

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

La reozonización no mostró un efecto significativo ( $p < 0.05$ , letras minúsculas) sobre la PTM, AT, pH, SST,

stress and induces cell lysis (Martins-Pinheiro et al., 2019; Xue et al., 2023). According to Xue et al. (2023), the effectiveness of ozone is also closely related to temperature, as its stability improves in acidic media when combined with low temperatures (pH 3.0 and 8.0 °C). Therefore, it is suggested that future research evaluate the synergistic effect of ozone and refrigeration on the microbiological and biochemical stability of aguamiel.

Based on the results shown in Figures 2 and 3, it is suggested that re-ozonation of *aguamiel* at 24 hours of storage could significantly reduce the microbial load. This is because, at 24 h, TMP was lower, and some physicochemical properties (TSS and ethanol concentration) remained more stable compared to the samples stored for 48 h.

Finally, it is important to highlight that re-ozonation significantly affected the AA of aguamiel quantified by both methods (Table 2). Samples exposed for 6 and 12 min of ozone showed a 35 % decrease in AA at 72 hours of storage compared to the control.

## Conclusions

Aguamiel exposed for 6 and 12 min to ozone maintained a low total microbial population during the first 24 hours of storage compared to the control. However, ozone did not help preserve the original physicochemical and nutraceutical quality of aguamiel. Re-ozonation applied at 48 hours of storage had only impact on antioxidant activity, reducing it by up to 35 % compared to the control, without contributing to microbial stabilization. Due to the lack of information on the use of non-thermal technologies for aguamiel preservation, the results of this study provide a foundation for future research focused on the preservation of traditional beverages. It is recommended to explore the potential synergistic effect between ozone and refrigeration to improve the shelf life of aguamiel, as in the present study, the treatments were stored at room temperature.

## Acknowledgments

The first author thanks the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCY) for the scholarship granted to carry out her Master's studies (registration number: 746875).

*End of English version*

---

concentración de etanol ni CFST durante el periodo de 48 a 72 h (Cuadro 2). Esto se puede atribuir a la influencia de diversos factores sobre la eficiencia del ozono, como el pH del medio, temperatura, humedad, concentración y tiempo de contacto, composición de la muestra, tipo de microorganismos y su estado fisiológico, entre otros (Kim et al., 2003; Xue et al., 2023). En este sentido, dado que las muestras de aguamiel presentaban un pH ácido (2.64 - 2.78), la efectividad del ozono se vio afectada negativamente. En particular, el pH ácido del aguamiel (2.64 - 2.78) redujo la efectividad del ozono, ya que su capacidad oxidativa es mayor en medios básicos debido a la formación de radicales hidroxilo, cuyo potencial de oxidación es mayor de 2.80 V (Panigrahi et al., 2020).

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

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

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

Por último, es importante destacar que la reozonización afectó significativamente la AA del aguamiel cuantificada por los dos métodos (Cuadro 2). Las muestras tratadas con 6 y 12 min de ozono presentaron una disminución de 35 % en la AA a las 72 h de almacenamiento en comparación con el testigo.

## References / Referencias

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). *Official methods of analysis* (18th ed.). Association of Official Agricultural Chemists.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Official methods of analysis* (19th ed.). Association of Official Agricultural Chemists.
- Ari, B., Budak, N. H., Seydim, A. C., & Güzel-Seydim, Z. (2020). Effects of ozonation on apple juice quality. *International Journal of Fruit Science*, 20(3), 1-9. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1822263>
- Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In B. O. Arredondo-Vega, D. Voltolina, T. Zenteno-Savín, M. Arce-Montoya, G. A. Gómez-Anduro (Eds.), *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (pp. 21-29). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). El pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova*, 5(8), 135-146. <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- Chauhan, M., & Negi, P. S. (2024). Ultrasonication and ozone processing of *Syzygium malaccense* juice for retention of bioactive components. *Journal of Food Science and Technology*, 62, 519-529. <https://doi.org/10.1007/s13197-024-06042-9>
- Contreras-López, E., Félix-Reyes, N. L., González-Olivares, L. G., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Añorve-Morga, J., López-Hernández, B. A., Vélez-Rivera, N., & Ramírez-Godínez, J. (2023). Aguamiel enhance proteolytic activity and survival of *Lactiplantibacillus pentosus* ABHEAU-05 during refrigerated storage of a fermented milk. *Fermentation*, 9(9), 841. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090841>
- Davis, P. L., & Chace, W. G. (1969). Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace1. *HortScience*, 4(2), 117-118. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.4.2.117>
- de la Rosa, O., Flores-Gallegos, A. C., Ascacio-Valdès, J. A., Sepúlveda, L., & Aguilar, C. N. (2023). Bioprocess development for fructooligosaccharides and carotenoids production using *Agave* mead. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 54, 102956. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102956>
- Enríquez-Salazar, M. I., Veana, F., Aguilar, C. N., de la Garza-Rodríguez, I. M., López, M. G., Rutiaga-Quiñones, O. M., Morlett-Chávez, J. A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food*

## Conclusiones

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

## Agradecimientos

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

## Fin de la versión en español

- Science and Biotechnology*, 26(4), 1003-1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>
- Epelle, E. I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Okolie, J. A., Mackay, W., Rateb, M., & Yaseen, M. (2023). Ozone application in different industries: A review of recent developments. *Chemical Engineering Journal*, 454, 140188. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140188>
- Escalante, A., López-Soto, D. R., Velázquez-Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- García-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00111-6>
- García-Mateos, M. R., Quiroz-González, B., Corrales-García, J., Ybarra-Moncada, M. C., & Leyva-Ruelas, G. (2019). Ozone-high hydrostatic pressure synergy for the stabilization of refrigerated pitaya (*Stenocereus pruinosus*) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56, 102187. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102187>
- Gorzelay, J., Zardzewiały, M., Findura, P., Kapusta, I., Street, Z., & Street, C. (2024). Effect of ozone gas on selected

- microbiological, chemical, electrical and organoleptic properties of craft wheat beers enriched Japanese quince fruit (*Chaenomeles L.*). *Acta Universitatis Cibinensis*, 28(1), 79-92. <https://doi.org/10.2478/auaft-2024-0007>
- Guzmán-Pedraza, R., & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Kim, J. G., Yousef, A. E., & Khadre, M. A. (2003). Ozone and its current and future application. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167-218. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)45005-5](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)45005-5)
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>
- Martínez-Zavala, M., Cruz, M., Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Contreras, J. C., Neira-Vielma, A. A., & Belmares, R. (2023). Develop of agave syrup using emerging technology by ohmic heating. *Food and Humanity*, 1, 1637-1644. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.11.012>
- Martins-Pinheiro, A., Salla, M. R., & Bolanos-Rojas, M. L. (2019). Tratamiento de aguas residuales provenientes de industria de productos de limpieza y desinfectantes por ozonización convencional y catalítica. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 27(2), 223-235. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052019000200223>
- Melini, F., & Melini, V. (2021). Impact of fermentation on phenolic compounds and antioxidant capacity of quinoa. *Fermentation*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010020>
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2(3), 161-171. <https://doi.org/10.1080/13510002.1996.1747044>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Ojo, A. O., & de Smidt, O. (2023). Lactic acid: A comprehensive review of production to purification. *Processes*, 11(3), 688. <https://doi.org/10.3390/pr11030688>
- Pandiselvam, R., Singh, A., Agriopoulou, S., Sachadyn-Król, M., Aslam, R., Gonçalves-Lima, C. M., Khanashyam, A. C., Kothakota, A., Atakan, O., Kumar, M., Mathanghi, S. K., & Mousavi-Khaenegah, A. (2022). A comprehensive review of impacts of ozone treatment on textural properties in different food products. *Trends in Food Science and Technology*, 127, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.008>
- Panigrahi, C., Mishra, Hari, N., & De, S. (2020). Effect of ozonation parameters on nutritional and microbiological quality of sugarcane juice. *Journal of Food Process Engineering*, 43(11), e13542. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13542>
- Rao, W., Fang, Z., Chen, Z., Wu, J., & Fang, X. (2023). Antibacterial mechanism of metabolites of *Leuconostoc mesenteroides* against *Serratia liquefaciens*. *Lwt*, 187, 115335. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115335>
- Rocha-Arriaga, C., & Cruz-Ramirez, A. (2022). Yeast and nonyeast fungi: the hidden allies in pulque fermentation. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100878. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100878>
- SAS Institute, Inc. (2002). User's guide (ver. 9) [software]. SAS Institute, Inc. [https://www.sas.com/es\\_mx/home.html](https://www.sas.com/es_mx/home.html)
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Tiwari, B. K., Cullen, P., Brennan, C. S., & O'Donnell, C. P. (2013). Non thermal processing. In B. K. Tiwari, N. P. Brunton, & C. S. Brennan (Eds.), *Handbook of Plant Food Phytochemicals* (pp. 273-299). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch13>
- Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca Morales, R., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *Springer Plus*, 3(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-583>
- Velázquez-López, A., Covatzen-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., & Vela-Gutiérrez, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido-lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *CienciaUAT*, 13(1), 165-178. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>
- Wang, X., Liu, Q., Han, Y., Zong, W., Ge, Z., & Wei, X. (2024). *Alternaria* mycotoxin degradation and quality evaluation of orange juice by ozone treatment. *Journal of Food Process Engineering*, 47(8), e14703. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14703>
- Xue, W., Macleod, J., & Blaxland, J. (2023). The use of ozone technology to control microorganism growth, enhance food safety and extend shelf life: A promising food decontamination technology. *Foods*, 12(4), 814. <https://doi.org/10.3390/foods12040814>
- Zardzewiały, M., Belcar, J., & Gorzelany, J. (2023). The use of gaseous ozone to reduce the microbial load of rhubarb (*Rheum L.*) petioles as an additive to craft wheat beers. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 27(2), 231-242. <https://doi.org/10.2478/auaft-2023-0019>
- Zhang, H., Wang, M., & Xiao, J. (2022). Stability of polyphenols in food processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 102, 1-45. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.006>
- Zhao, L. (2019). SAS for mixed models: Introduction and basic applications. *International Statistical Review*, 87(2), 449-450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/insr.12348>