



183  
dej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION MICROBIOLOGICA Y  
BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION DE  
TIBICOS EN PILONCILLO.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
MA. TERESA RUBIO MONROY

MEXICO, D. F.

1991

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

1. Justificación .....	1
2. Resumen .....	3
3. Introducción .....	6
3.1. Alimentos fermentados de México .....	7
3.1.1. Tibicos .....	8
3.2. Antecedentes generales sobre tibicos .....	9
3.3. Aplicaciones experimentales de tibicos ....	14
4. Materiales .....	19
4.1. Sustrato de fermentación .....	19
4.1.1. Inóculo .....	19
4.2. Proceso de fermentación .....	20
4.3. Muestreos .....	20
5. Métodos analíticos .....	23
5.1. Análisis microbiológicos .....	23
5.1.1. Cuantificación .....	23
5.1.2. Identificación de levaduras .....	25
5.1.3. Identificación de bacterias .....	26
5.2. Análisis bioquímicos.....	27
5.2.1. Determinación de pH .....	27
5.2.2. Acidez titulable .....	27
5.2.3. Determinación de peso (húmedo y seco) .....	29
5.2.4. Proteína cruda .....	29
5.2.5. Proteína soluble .....	29
5.2.6. Carbohidratos totales .....	29
5.2.7. Carbohidratos reductores .....	30
5.2.8. Ácidos orgánicos y etanol .....	30
5.2.9. Ácido láctico .....	31

6. Resultados y discusión .....	32
6.1. Análisis microbilógicos .....	32
6.2. Cinética microbiana .....	33
6.2.1. Levaduras .....	33
6.2.2. Bacterias mesófilas aerobias .....	36
1). Bacilos .....	37
2). Enterobacterias .....	39
3). Bacterias lácticas .....	41
6.3. Análisis bioquímicos .....	59
6.3.1. pH .....	59
6.3.2. Acidez titulable .....	59
6.3.3. Carbohidratos totales .....	61
6.3.4. Carbohidratos reductores .....	62
6.3.5. Proteína soluble .....	63
6.4. Análisis de los productos de fermentación .....	70
6.4.1. Ácido láctico .....	70
6.4.2. Etanol .....	71
6.4.3. Ácido acético .....	72
6.5. Análisis bioquímicos efectuados en típicos .....	78
6.5.1. Humedad .....	78
6.5.2. Peso seco .....	79
6.5.3. Proteína cruda .....	80
7. Conclusiones .....	85
8. Sugerencias .....	87
9. Bibliografía .....	89

## 1. JUSTIFICACIÓN

Para la humanidad, así como para todas las criaturas de la Tierra, el alimento es la sustancia de la vida, es el medio por el cual cada individuo mantiene su propia naturaleza. Los seres humanos hemos compartido nuestra alimentación desde hace siglos, ya sea en una comunidad o entre grupos sociales, como un signo de paz y amistad. Estas tradiciones expresan la importancia de la naturaleza para el hombre, así como la necesidad que tiene el ser humano de buscar nuevas alternativas utilizando como recurso la ciencia, para acabar con la malnutrición y el hambre.

México es un país multiétnico, en donde los factores culturales juegan un papel muy importante en la identidad nacional, razón por la cual es necesario pugnar por los valores propios de nuestro país, abandonando intereses ajenos a la nación, sobre todo en lo referente a la nutrición. Este aspecto resulta de gran importancia puesto que está ligado a la cultura de un pueblo donde quedan implicados contextos sociales y económicos.

Gran variedad de alimentos y bebidas fermentados forman parte importante de la dieta de muchos grupos étnicos, y son consumidos con fines nutricionales,

medicinales, rituales, refrescantes o hasta estimulantes. Por ello nos percatamos de que el estudio de los alimentos y bebidas tradicionales constituye un amplio campo de trabajo para el biólogo, el cual cuenta con los conocimientos necesarios para realizar investigaciones en este aspecto.

En la actualidad algunos productos de fermentación son ampliamente conocidos y se elaboran tanto a pequeña como a gran escala. Sin embargo, aún existen numerosos alimentos y bebidas indígenas de México que no requieren de una tecnología muy avanzada para su elaboración; por el contrario, tanto el material como el método de producción son sencillos, accesibles y de bajo costo, por lo que se pueden producir a nivel doméstico. Sin embargo, por lo general este tipo de alimentos sólo son consumidos regionalmente y no se conocen fuera de su lugar de origen.

Por todo esto, se considera de gran importancia el llevar a cabo estudios étnicos, microbianos, bioquímicos y nutricionales que aporten nuevos conocimientos al respecto, y que permitan desarrollar algunas opciones biotecnológicas para contribuir a solucionar los problemas alimentarios de nuestro país.

## 2. RESUMEN

Los tibicos han sido descritos como microbiogleas, constituidas en su mayor parte por dextranas, en las que se encuentran embebidas asociaciones de bacterias y levaduras. En México y en algunos países de Europa se han empleado para elaborar bebidas fermentadas utilizando como sustrato soluciones azucaradas o el jugo de diversas frutas.

En nuestro país, el estudio de estas microbiogleas es bastante reciente y se ha enfocado primordialmente a la identificación de los microorganismos que constituyen dicha asociación; sin embargo el proceso de fermentación no había sido investigado hasta recientemente.

En este trabajo se realizaron muestreos a diferentes tiempos de fermentación, con la finalidad de estudiar la sucesión microbiana y los cambios ocurridos en la concentración de diversos compuestos químicos en el líquido de fermentación, así como los cambios en el peso y en el contenido de proteína de los tibicos durante el transcurso del proceso.

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico indicaron que durante la fermentación predominaron las bacterias lácticas, mientras que las levaduras presentaron un incremento poblacional a la mitad del proceso. Durante la fermentación se aislaron e

identificaron varias especies del género *Bacillus* (*B. brevis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. polymyxa* y *B. pumilus*); además se encontró una bacteria fijadora de nitrógeno, identificada como *Enterobacter aerogenes*, así como diversas bacterias lácticas no identificadas hasta especie, de las cuales cuatro fueron homolácticas y tres heterolácticas. Las levaduras identificadas fueron: *Brettanomyces claussenii*, *Candida guilliermondii*, *Candida valida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Los estudios bioquímicos indicaron que el pH disminuyó drásticamente en las primeras 24 horas de fermentación, hasta alcanzar valores que oscilaban entre 3.0 y 2.8, por lo que el sustrato se acidificó notablemente. El contenido de carbohidratos totales disminuyó de 44.1 a 26.1 mg/ml en la primera fermentación, y de 46.34 a 24.6 mg/ml en la segunda, y el de proteína soluble aumentó de 0.47 a 0.83 mg/ml, y de 0.64 a 0.86 mg/ml, con una tenendencia a mantenerse constante. El contenido de etanol presentó un incremento notable a la mitad de la fermentación, de 0.012 a 0.15 mg/ml, y de 0.045 a 0.15 mg/ml; el ácido acético se incrementó paulatinamente durante el proceso, con valores de 0.068 a 0.23 mg/ml, y de 0.097 a 0.24 mg/ml;



el ácido láctico presentó un valor inicial de 0.03 y de 0.031 mg/ml; el valor máximo se detectó a las 42 horas en ambas fermentaciones con 0.59, y 0.51 mg/ml; posteriormente se observó un decremento.

Respecto a los análisis efectuados a los tibicos, se observó un leve incremento en la biomasa y en el contenido de proteína cruda, así como un aumento en el contenido de humedad de las biogleas.

El seguimiento microbiológico y los análisis bioquímicos efectuados permitieron correlacionar los cambios ocurridos durante ambos procesos de fermentación.

### 3. INTRODUCCION

Los alimentos fermentados son productos elaborados mediante procesos de fermentación ancestrales y empiricos que han sido transferidos de una generación a otra y de los que en su mayoría los grupos indígenas desconocen su composición microbiana. Dichas fermentaciones implican técnicas sencillas y baratas que no requieren de equipos complicados y que emplean materias primas disponibles y de bajo costo, por lo que estos procesos carecen de un control desde el punto de vista microbiológico, lo que dificulta la obtención de productos higiénicos o de calidad regular ( Hesseltine, 1965).

Los alimentos fermentados han despertado el interés de investigadores de diversas disciplinas, como son las antropológicas, las sociales y las científicas (química y biología); estas últimas han aportado conocimientos acerca de la importancia nutricional y microbiológica de estos productos, lo que ha contribuido a valorar dichos productos y que se conozcan en diferentes regiones y no sólo en su lugar de origen.

Los alimentos fermentados tradicionales ofrecen un amplio campo de estudio para la ciencia básica, pues a

partir de estas investigaciones pueden desarrollarse procesos de fermentación controlados que aseguren la calidad higiénica de los productos con posibilidades de industrialización, obteniendo productos útiles para el hombre. Además, en el futuro pueden ser una fuente de producción de alimentos y diversas sustancias derivadas de las fermentaciones, capaces de solucionar algunos problemas alimentarios de la creciente población mundial (Wacher et al., 1991).

### 3.1. ALIMENTOS FERMENTADOS DE MÉXICO

Antes de la llegada de los españoles, México contaba con una gran variedad de productos alimenticios, tanto vegetales (legumbres, cereales y frutos) como animales (insectos y vertebrados). Entre las técnicas que utilizaban para preparar y conservar sus alimentos se encontraba la fermentación, que era producida por la acción de microorganismos y que fue descubierta de manera empírica (Casillas y Vargas, 1984).

En la actualidad, México tiene más de 70 grupos étnicos, la mayoría de los cuales utiliza el proceso de fermentación para elaborar tanto alimentos como bebidas que son consumidos con diversos fines, ya sean estimulantes, medicinales, alimenticios, rituales y/o religiosos (Ulloa et al., 1987).

Recientemente se han realizado estudios étnicos, microbianos y bioquímicos sobre algunos de estos alimentos, que han aportado nuevos conocimientos; tal es el caso del pulque, del pozol, del tesgüino, de la tuba, del colonche y del tepache, así como de las bebidas elaboradas con tibicos, entre otros; sin embargo aún falta mucho por investigar (Ulloa et al., 1987; Godoy, 1987).

### 3.1.1. Los tibicos

En el caso de la fermentación casera de colonche (elaborado con jugo de tunas) y de tepache (preparado con jugo de caña, de piña, de naranja, piloncillo o melaza) se utilizan ocasionalmente las microbiogleas conocidas popularmente como tibicos (Ruiz-Oronoz 1932; Mascott y Terrés, 1952).

La descripción morfológica de los tibicos fue realizada inicialmente por Lutz en 1898. Actualmente se les define como microbiogleas o masas compactas y gelatinosas de color blanco amarillento, translúcidas u opalescentes, de forma irregular y de tamaño variable, desde unos cuantos milímetros hasta uno o dos centímetros, en donde se encuentran embebidas bacterias y levaduras, constituyendo una asociación muy estable con capacidad de fermentar sustratos azucarados,

sin permitir el desarrollo de microorganismos patógenos en el transcurso de la fermentación (Ulloa y Herrera 1981).

### 3.2. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE TIBICOS

Aunque estas biogleas han sido utilizadas en México desde la época prehispánica, el origen de la palabra tibicos aún es incierta, ya que, según algunas investigaciones, no proviene de la lengua náhuatl, pues en dicha lengua no existe el sonido de la letra b (Moreno y Díaz, 1932; Ruiz Oronoz, 1932; Godoy, 1987). Sin embargo, se sabe de ciertos lugares en México donde los tibicos son conocidos como "algas marinas", "búlgaros de agua" o "granillo" (Ulloa y Herrera, 1981; Estrada Cuéllar, 1985). En Inglaterra se denominan "gingerbeer plant" (Hesseltine, 1965), "california bees" (Ward, 1892 y Kleber, 1921, en Bibbins, 1990), Lutz (1899), Horisberger (1969) y Moinas et al. (1980) los reportan como "tibi grains". Cabe mencionar que todas estas asociaciones parecen tener un mismo origen (Pidoux, et al. 1990).

Dichas microbiogleas están constituidas principalmente por agua y una matriz de dextrana insoluble en agua dispuesta en dos capas (Horisberger, 1969), que es

sintetizada por *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen) (Pidoux, 1988) y por *L. hilgardii* (Pidoux, 1989).

Los tibicos se han utilizado popularmente en México (a nivel doméstico) para producir bebidas refrescantes de bajo contenido alcohólico y acético, cuando el tiempo de fermentación es corto, pero si la fermentación se prolonga por más tiempo se transforma en una bebida alcohólica y después en vinagre (Hesseltine, 1965; Taboada et al., 1986). Algunas personas beben el "tepache de tibicos" con la intención de reducir de peso, combatir la arteriosclerosis y de prevenir algunos males cardíacos (Saint-Phard-Delva, 1984).

El origen de los tibicos aún es incierto, pero se cree que son originarios de México y que se forman en los artículos de diversas especies de *Opuntia* como masas globosas, transparentes, muy semejantes a los granos de arroz cocido (Lutz, 1899, en Ruiz-Oronoz, 1932). Varios autores han descrito la formación de estas microbiogreas a partir de una nata blanca y delgada que se forma en la superficie del líquido fermentado por tibicos, la que al irse engrosando durante el proceso de fermentación se sedimenta y forma los granos compactos en el fondo (Ruiz-Oronoz 1932; Mascott y Terrés, 1952).

Lutz realizó los primeros estudios sobre tibicos a finales del siglo pasado, al tratar de esclarecer la

participación de los microorganismos, embebidos en las masas gelatinosas que crecían en los cladodios y frutos de varias especies de nopales, en la fermentación del colonche. Las describió como zoogleas o masas blancas, translúcidas, semejantes a granos de arroz cocido y las denominó tibi. De estas masas aisló una levadura que identificó como *Saccharomyces radaisii* y una bacteria que denominó *Bacillus mexicanus*. Propuso que *B. mexicanus* era una bacteria aerobia, que durante su metabolismo creaba un ambiente anaerobio óptimo para la levadura *S. radaisii*, por lo que supuso que estos microorganismos eran los responsables del proceso de fermentación del jugo de tunas conocido en México como colonche. Esta es una bebida autóctona elaborada con jugo de tunas, cuya fermentación se acelera agregándole colonche viejo o cáscaras de tuna que contengan dichas biogleas (Ulloa y Herrera, 1978).

No fue hasta 1932 cuando Ruiz Oronoz retomó la investigación micológica de Lutz, y describió las características morfológicas y fisiológicas de una levadura a la que denominó *Pichia radaisii* (Lutz) Ruiz Oronoz. En ese mismo año Moreno y Díaz efectuó un análisis bacteriológico y químico del vinagre elaborado con tibicos, del que aisló e identificó a *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers, *Proteus vulgaris*

Hauser, *Bacillus subtilis* (Ehrenber) Cohn, *B. graveolans* Meyer et Gottheil, y *Acetobacter peroxydans* Visser't Hooft, así como la levadura *Saccharomyces ellipsoideus* Meyen ex Hansen. Según la autora, *A. peroxydans* era la responsable del aumento en la acidez del sustrato.

En 1952, Mascott y Terrés aisló y estudió las levaduras de los tibicos "del arroz" (nombre que les asignó por su apariencia). Identificó las especies *Saccharomyces oviformis* Osterwalder y *Pichia chodatii* (Zender) Dekker var. *trumpyi* (Zender et Bevan) Dekker. Además reportó la presencia de varias especies de *Corynebacterium*, las que en combinación con las levaduras consideró que eran las responsables del decremento de pH durante el proceso de fermentación.

Siguiendo con los estudios microbianos de los tibicos, Ulloa y Herrera (1981) encontraron las levaduras *Pichia membranaefasciens* Hansen y *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen.

En 1984, Herrera et al. realizaron un estudio sobre algunas bacterias presentes en los granos de tibicos. Encontraron una bacteria fijadora de nitrógeno, a la que identificaron como *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop.

En 1985, Estrada Cuéllar efectuó un trabajo sobre las levaduras que forman parte de la asociación microbiana de los tibicos. Aisló e identificó las



levaduras *Brettanomyces intermedius* (Krumbholz et Tauschanoff). van der Walt et van Kerken, y *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen.

También se han efectuado algunos estudios con el fin de dilucidar la estructura y composición de los tibicos. En 1980, Moinas et al realizaron un estudio de microscopía de luz, de transmisión y de barrido, y observaron que los granos de tibicos estaban constituidos por dos capas, una capa externa compacta compuesta por D-glucosa, en la que se encuentran embebidas bacterias (lactobacilos y estreptococos) y levaduras (Horisberger, 1969), y una capa interna esponjosa, constituida por gran cantidad de dextranas. Los granos se ahuecan en su interior debido a que, durante la fermentación, se produce CO<sub>2</sub> como resultado del metabolismo de algunos microorganismos.

En Europa, particularmente en Suiza, se han efectuado estudios químicos y estructurales de unos granos conocidos como tibi. Hesseltine (1965) describió a los tibi como granos translúcidos, de 1 cm de diámetro, cerosos y de consistencia flexible, que han sido utilizados en Suiza para elaborar una bebida ácida, moderadamente alcohólica. El autor halló semejanza entre esta fermentación y la de la cerveza de jengibre. Cabe mencionar que aun en Europa se considera a los tibi como originarios de México (Horisberger, 1969).

### 3.3. APLICACIONES EXPERIMENTALES DE TIBICOS

Algunos investigadores se interesaron en encontrar un uso práctico a los estudios básicos realizados sobre tibicos, a través del cultivo de microorganismos aislados de estas microbiogleas capaces de incrementar el valor nutricional del alimento humano o animal. En 1984 Saint-Phard-Delva utilizó la bacteria fijadora de nitrógeno *Klebsiella oxytoca*, aislada anteriormente de tibicos por Herrera et al. (1984), con el fin de enriquecer el contenido proteico de la fermentación de plátano maduro en estado sólido. En el transcurso de la fermentación observó que se presentaba un incremento proteico de un 6 a un 12%. El producto de este experimento se utilizó para elaborar un alimento para monogástricos.

En 1986, Taboada et al. utilizaron tibicos en diferentes proporciones como componentes de la dieta de algunas especies de aves y roedores, para determinar el efecto que causaban en el peso de los animales, así como en la postura de huevos. Los resultados obtenidos indicaron que el peso de los animales aumentó menos que con el alimento común y se redujo la postura de huevos en las aves que consumían más del 50% de tibicos en su dieta. Al realizar un análisis histológico de los

animales utilizados no se encontraron lesiones en ninguno de los órganos estudiados (hígado, riñón, corazón y pulmones). Además se observó que en el caso de ratas y aves ocurría una degeneración grasa del hígado, incrementándose en los animales que consumieron más del 50% de tibicos en su dieta, por lo que llegaron a la conclusión de que los tibicos pueden utilizarse como complemento del alimento balanceado para animales de traspatio, pero en proporciones menores al 50% de la dieta, de lo contrario pueden presentarse deficiencias nutricionales.

Debido a que el cultivo de tibicos constituye un sistema microbiológico estable de fácil producción, además de ofrecer posibilidades alimentarias rápidas y de bajo costo (Ulloa et al., 1981), resultó interesante realizar algunos estudios sobre la producción casera de tibicos; Serrano (1986) y Díaz-Garcés et al. (1988) determinaron algunas de las condiciones del cultivo doméstico de los tibicos con el fin de obtener el mayor rendimiento de biomasa en relación con el tipo y cantidad de sustrato, temperatura y tiempo de incubación.

En 1990, Armijo estudió el efecto de algunos parámetros en la producción casera de tibicos, con el fin de aportar nuevos conocimientos sobre las

condiciones más favorables para su cultivo doméstico. Los objetivos de dicho trabajo fueron: a) determinar el efecto del pH inicial y de la aireación sobre la cantidad de biomasa producida, así como la concentración de los productos de fermentación (etanol y ácido acético); b) determinar el efecto de tres sustratos (piloncillo, melaza y sacarosa) sobre la producción de etanol y ácido acético; c) aislar e identificar las especies de levaduras presentes en las microbiogreas y en los diferentes sustratos de fermentación, d) determinar el efecto de la esterilidad o no esterilidad de los sustratos de piloncillo y melaza.

Los resultados obtenidos indicaron que: el control del pH no tuvo ningún efecto sobre la producción de biomasa. Las concentraciones de ácido acético y etanol no se vieron afectadas con el uso de amortiguadores. La aireación no tuvo ningún efecto promotor en la producción de biomasa, etanol y ácido acético. En el sustrato con melaza hubo mayor producción de etanol y ácido acético que en el de piloncillo. Respecto al análisis micológico, la autora aisló dos especies de levaduras, identificadas como *Candida valida* (Leberle) y *Candida famata* (Harrison) Meyer et Yarrow, la segunda registrada por primera vez para tибicos, pues *C. valida* es el estado asexual de *Pichia membranaefaciens*, que ya

había sido reportada (Ulloa y Herrera, 1981). En el caso de los cultivos efectuados en melaza se observó la formación de una nata pulverulenta constituida principalmente por pseudomicelio de *Candida valida*, en cambio el piloncillo favoreció la formación de una nata blanca y gruesa constituida por una matriz en la que se encontraban embebidas diversas bacterias y levaduras (Armijo et al., 1991).

Es importante mencionar que el estudio de estas biogleas ha resultado de gran interés para diversos investigadores, pues desde finales del siglo pasado se comenzó a estudiar en Francia y Alemania el grave problema que causaba la formación de masas mucilaginosas en los jugos de remolacha, conocidos en Francia como "gome de sucrerie" y en Alemania como "Frosch laich". Estos mucílagos afectaban seriamente los procesos de clarificación, filtración y cristalización en la fabricación de azúcar, causando grandes pérdidas industriales, debido a que las gomas son insolubles, elásticas y cartilaginosas; por otra parte, se sabe que la goma es producida rápidamente por *Leuconostoc* sp. (Grove, 1984, en Bibbins, 1990).

Como se puede apreciar, el estudio de estas microbiogleas en nuestro país es bastante reciente y el proceso de fermentación había sido poco estudiado, por

lo que el presente trabajo tuvo como finalidad llevar a cabo dos cinéticas de fermentación en soluciones estériles de piloncillo inoculadas con tibicos. Se llevaron a cabo muestreos a diferentes tiempos de fermentación con los siguientes objetivos:

- Estudiar la sucesión microbiana durante todo el proceso fermentativo.

- Aislar e identificar a los microorganismos responsables de la fermentación del sustrato.

- Cuantificar por cromatografía de gases algunos productos de fermentación.

- Correlacionar los cambios microbiológicos con los cambios bioquímicos ocurridos durante ambas fermentaciones.

#### 4. MATERIALES

##### 4.1. SUSTRATO DE FERMENTACIÓN

El sustrato empleado fue una solución de piloncillo al 5%. Se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de sustrato por matraz, tapados con torundas de algodón cubierta con manta de cielo y papel aluminio. Enseguida se esterilizaron a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Para probar la esterilidad del sustrato se sembraron alícuotas de 0.1 ml del mismo en placas de medio de Agar Papa Dextrosa (APD, Merck 10130), Agar para Cuenta en Placa (ACP, Merck 5463) y Agar de Man, Rogosa y Sharpe (AMRS, Oxoid CM 359). La muestra se extendió en toda la superficie de la placa con una varilla de vidrio doblada en ángulo recto; las cajas se incubaron a 27<sup>o</sup> C durante 48 horas.

##### 4.1.2. INÓCULO

Los tibicos utilizados para este trabajo fueron proporcionados por el M. en C. Javier Taboada Ramírez, del Instituto de Química de la UNAM. Dichos tibicos se encontraban deshidratados, por lo que se sometieron a los siguientes tratamientos: se enjuagaron con agua corriente en una coladera de metal cubierta de manta de

cielo. Posteriormente se hidrataron durante 24 horas en un recipiente de vidrio que contenía agua destilada, se enjuagaron bien con agua destilada nuevamente y en seguida se drenaron.

#### 4.2. FERMENTACIÓN

Para este estudio se realizaron dos fermentaciones, ambas bajo las mismas condiciones que posteriormente se describen.

En cada matraz con 200 ml de sustrato estéril se inocularon asépticamente, en una campana de flujo laminar, 6 g del inóculo (Figura 1). La fermentación se realizó en los matraces tapados con torundas de algodón y manta de cielo, sin agitación, a una temperatura de 27<sup>o</sup> C en una incubadora (Riossa modelo Ec) durante dos semanas, en el transcurso de las cuales se llevaron a cabo los muestreos correspondientes.

#### 4.3. MUESTREOS

Se tomaron muestras del líquido fermentado, escogiendo al azar un matraz por muestreo, en cada uno de los siguientes tiempos: 0, 9, 24, 42, 48, 72, 96, 168, 216 y 264 horas. El tiempo cero correspondió al muestreo inicial, efectuado inmediatamente después de inocular los tibicos al sustrato. Se tomó una muestra



del líquido de fermentación en condiciones asépticas para realizar los estudios microbiológicos correspondientes (Figura 1 ).

Inmediatamente después de la toma de la muestra se determinó el pH y la acidez del líquido. Posteriormente se filtró el líquido de fermentación a través de un papel filtro Whatman No. 4, previamente pesado. Se determinó el peso húmedo, el peso seco y el contenido de proteínas de los tibicos drenados. El líquido de fermentación filtrado se almacenó a temperatura de congelación para detener el proceso de fermentación, y se empleó posteriormente para realizar los análisis bioquímicos correspondientes (proteína soluble, carbohidratos totales y cromatografía de gases). El líquido de fermentación se descongeló a temperatura ambiente.

Los tibicos que quedaron en el papel filtro se pesaron para determinar su peso húmedo, y posteriormente se sometieron a un proceso de secado en una estufa Felisa Mod. 243 D a 90° C durante 24 horas para obtener su peso seco y así poder determinar su humedad.

Matraces con 200 ml de piloncillo al 5% (estéril)



6 g de tibicos, lavados e hidratados, por matraz



Incubar a 27°C durante diferentes tiempos  
(0, 9, 24, 42, 48, 72, 96, 168, 216 y 264 horas)



LIQUIDO DE  
FERMENTACION

LIQUIDO DE FERMENTACION  
FILTRADO

TIBICOS  
DRENADOS

Estudios microbianos  
Conteo y aislamiento  
en medios selectivos:  
APD acidificado para  
levaduras,  
ACP para mesófilos  
aerobios, y  
AMRS mas doble capa,  
para bacterias  
lácticas

Análisis químicos  
Proteína soluble,  
carbohidratos totales,  
carbohidratos reduc-  
tores

Análisis químicos  
Proteína cru-  
da, peso seco,  
humedad

Figura 1 . Diagrama de flujo que resume los estudios realizados durante la fermentación del líquido de piloncillo inoculado con tibicos.

## 5. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 5.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

#### 5.1.1. CUANTIFICACIÓN

Con la finalidad de aislar y cuantificar los microorganismos que se presentan en el transcurso de la fermentación (Figura 2), se llevaron a cabo diluciones decimales en serie ( $1/10$  a  $1/10^6$ ), utilizando soluciones de peptona estéril al 0.1%. De cada dilución se inocularon alícuotas de 0.1 ml en placas de cultivo (por triplicado), utilizando el método de extensión en placa.

Para la determinación de bacterias mesófilas aerobias se utilizó el medio de cultivo PCA, incubando las placas a una temperatura de  $27^{\circ}$  C durante 48 horas. Para levaduras y mohos se empleó el medio de PDA acidificado a pH 3.5 con ácido tartárico estéril al 10% (Harrigan, 1976). Para las bacterias lácticas se utilizó el medio AMRS. Debido a que estos microorganismos requieren de condiciones microaerofílicas para crecer, después de sembrar las placas se agregó una segunda capa del mismo medio (a  $45^{\circ}$  C) sobre el medio ya solidificado, con el fin de crear un ambiente de crecimiento adecuado. La cuantificación de las unidades

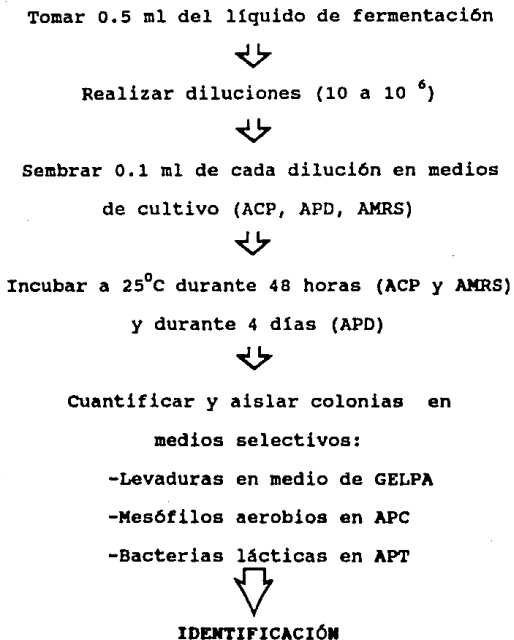


Figura 2 . Diagrama de flujo de los estudios microbianos realizados en cada tiempo de fermentación

formadoras de colonias se realizó en las placas donde hubo un número contable de colonias, de 30 a 300 (Harrigan y Mc Cance, 1976).

Para la obtención de los cultivos puros de bacterias y levaduras se hicieron resiembras, por el método de estrias múltiples, en placas de ACP, GELPA (Glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agar 20 g y agua destilada 1000 ml) y AMRS. Los cultivos obtenidos se mantuvieron en viales con medios de cultivo inclinado (empleando para las bacterias mesófilas aerobias y para las levaduras los medios ya mencionados) para su posterior identificación. Para el mantenimiento de los cultivos puros de bacterias lácticas se empleó el medio semisólido de APT (Bacto APT Difco, 0655/01/1), al que se le adicionó una punta de espátula con  $\text{CaCO}_3$  por vial, y que fueron inoculadas por picadura.

#### 5.1.2 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Cuando se constató que las colonias de levaduras estaban completamente puras, se llevó a cabo la identificación hasta especie, siguiendo los métodos de aislamiento, mantenimiento, clasificación e identificación de van der Walt y Yarrow (1984), y las claves taxonómicas generales de Kreger van Rij (1984),

así como las claves y descripciones genéricas de Fell, Statzell y Ahearn (1984), Meyer, Ahearn y Yarrow (1984), Rodriguez de Miranda, Van der Walt y Yarrow (1984), y Yarrow (1984).

### 5.1.3. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Para la identificación hasta especie de las bacterias mesófilas aerobias se siguió la metodología y claves taxonómicas propuestas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Sneath P.H.A., 1987) , así como las propuestas por Mac Faddin (1980) y por Richard (1984).

Las bacterias lácticas únicamente se agruparon según su metabolismo fermentativo en homo y heterolácticas. Las diferentes cepas se inocularon en medio APT y se incubaron a 48<sup>o</sup>C durante una semana; posteriormente se transfirieron a tubos con medio de Gibson, que consiste en un medio bien amortiguado que contiene glucosa, y se sellaron con cera estéril (Harrigan y Mc Cance, 1976). La producción de gas se observó por el rompimiento del medio y el desplazamiento del tapón, lo que demostró que el metabolismo de la bacteria era heterofermentativo.

## 5.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

### 5.2.1. DETERMINACIÓN DE pH

Para determinar el pH del líquido de fermentación se utilizó un potenciómetro Beckman modelo 141, el cual fue calibrado con soluciones reguladoras de pH 4 y 7. Las determinaciones se efectuaron directamente en el líquido de fermentación en cada tiempo de muestreo (Fig. 3).

### 5.2.2. ACIDEZ TITULABLE

Para determinar la acidez de cada una de las muestras se tomaron alícuotas de 10 ml del líquido filtrado de fermentación en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Se adicionó a cada matraz 0.1 ml de indicador de fenolftaleína (solución al 1% en etanol al 95%) y se tituló con una solución valorada de NaOH 0.01 N, hasta la aparición de un color rosado. Se calculó la acidez expresada como ácido láctico, por 100 g de muestra utilizando la siguiente fórmula:

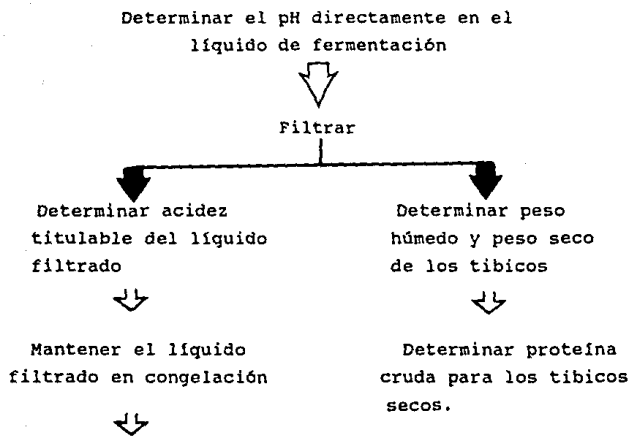
$$\% = \frac{\text{ml X eq. X N}}{\text{ml alícuota}}$$

X : Acidez expresada como ácido láctico

ml: de solución valorada de NaOH

eq: miliequivalente de ácido láctico.

N : Normalidad del NaOH (0.01 N)



Determinar:  
 proteína soluble, carbohidratos  
 totales, carbohidratos reductores,  
 ácidos orgánicos y etanol.

Figura 3 . Diagrama de flujo de los análisis bioquímicos realizados en cada tiempo de fermentación.



### 5.2.3. DETERMINACIÓN DEL PESO (húmedo y seco)

El contenido de cada matraz se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 4 previamente pesado. Se determinó el peso húmedo de los tibicos por diferencia de peso. Para determinar el peso seco, el papel filtro y los tibicos se sometieron a un proceso de secado a 90°C durante 24 horas en una estufa Felisa Mod. 243D.

### 5.2.4. PROTEÍNA CRUDA

Para conocer la concentración de proteína cruda de los tibicos se empleó el método de Microkjeldahl, según la metodología descrita por Pearson (1970), utilizando 0.4 g de tibicos deshidratados. El porcentaje de proteína se obtuvo multiplicando el contenido de nitrógeno obtenido por el factor 6.25.

### 5.2.5. PROTEÍNA SOLUBLE

La concentración de proteína soluble se determinó para el líquido de fermentación según el método de Lowry (Lowry et al 1951; Peterson, 1977).

### 5.2.6. CARBOHIDRATOS TOTALES

Para determinar la concentración de carbohidratos totales en el líquido de fermentación se siguió la

metodología del fenol-sulfúrico descrita por Dubois, Gilles y Hamilton (1956).

#### 5.2.7. CARBOHIDRATOS REDUCTORES

Siguiendo el método de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) de Bernfield (Summer y Howell, 1953), durante la fermentación, se determinó el contenido de carbohidratos reductores del sustrato.

#### 5.2.8. ÁCIDOS ORGÁNICOS Y ETANOL

El análisis para la cuantificación de los ácidos láctico y acético así como de etanol, fue realizado por la M. en C. Carmen Márquez en el Instituto de Química de la UNAM. A continuación se describen las condiciones en las que se llevaron a cabo dichos análisis.

Las muestras del líquido de fermentación se sometieron a un análisis en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Sigma 1-B, bajo las siguientes condiciones (Aguilera, 1989):

- Columna de vidrio Porapak Q de 5"/1.8"
- Temperatura de la columna: 150<sup>o</sup> C
- Temperatura del inyector: 120<sup>o</sup>C
- Temperatura del detector: 150<sup>o</sup> C
- Detector de ionización de flama
- Volumen de inyección: 1.0 µl
- Flujo de nitrógeno: 40 ml/min

### 5.2.9 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Para determinar la concentración de ácido láctico fue necesario realizar una esterificación previa. Se llevó a cabo el análisis cromatográfico en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890, bajo las mismas condiciones que las descritas por Aguilera (1989):

- Columna capilar de sílice fundido, recubierta con Carbowax 20M de 0.53  $\mu\text{m}$  de diámetro y 50 m de longitud.
- Temperatura de la columna: 110<sup>0</sup> C
- Temperatura del inyector y del detector: 200<sup>0</sup> C
- Detector de ionización de flama
- Flujo de nitrógeno
- Volumen de inyección: 1.2  $\mu\text{l}$

Cabe señalar que cada análisis se realizó por triplicado; sin embargo, no se realizaron repeticiones de proteína cruda de tiburidos debido a que no se contaba con suficiente muestra para tal efecto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

El sustrato empleado para realizar la fermentación fue previamente esterilizado para evitar la interferencia de otro tipo de microorganismos que no fueran los que se encontraban embebidos en la bioglea. Debido a esto, los microorganismos encontrados durante los muestreos reflejan parte de la microbiota existente en los tibicos, ya que se desconoce cuáles son los microorganismos que se encuentran inmovilizados en las biogleas utilizadas. Se realizaron dos fermentaciones idénticas de tibicos en soluciones estériles de piloncillo. En la tabla 1 se indica el número de unidades formadoras de colonias de cada microorganismo (la cuantificación corresponde al tiempo cero de la fermentación). Los microorganismos predominantes durante ambas fermentaciones fueron las bacterias lácticas; sin embargo, debido a que en los tibicos existe una microbiota mixta, donde cada microorganismo tiene necesidades alimenticias y fisiológicas determinadas, y unos microorganismos pueden ser más exigentes que otros en sus requerimientos, la sucesión microbiana varió en el transcurso de la fermentación.

Tabla 1. Cuantificación de levaduras, mesófilos aerobios y bacterias lácticas (ufc/ml) al tiempo cero de las fermentaciones.

Microorganismo	1 <sup>a</sup> Fermentación ufc/ml	2 <sup>a</sup> Fermentación ufc/ml
Levaduras	$3.4 \times 10^2$	$3.5 \times 10^3$
Mesófilos aerobios	$4.2 \times 10^3$	$4.8 \times 10^4$
Bacterias lácticas	$4.6 \times 10^4$	$5.2 \times 10^4$

## 6.2. CINÉTICA MICROBIANA

### 6.2.1. LEVADURAS

En la figura 4 se puede apreciar que durante ambas fermentaciones varió la población de levaduras, mismas que se presentaron desde el inicio del proceso fermentativo y alcanzaron su valor máximo a las 96 horas de fermentación:  $6.0 \times 10^4$  ufc/ml para la primera fermentación, y de  $6.9 \times 10^4$  ufc/ml para la segunda.

A continuación se discuten las especies de levaduras halladas en el líquido de fermentación.

*Brettanomyces claussenii* Custers. Esta levadura se caracteriza principalmente por la producción vigorosa de ácido acético y etanol a partir de glucosa. Es reportada

aquí por primera vez para tibicos. Cabe señalar que Estrada Cuéllar (1985) aisló la levadura *B. intermedius* Krum y Tausch de una muestra de tibicos procedentes de la Ciudad de México.

*Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron et Guerra. Es la fase asexual de *Pichia guilliermondii*. Se le considera como un organismo patógeno oportunista, que presenta un metabolismo fermentativo y oxidativo. Es capaz de formar película por lo que, posiblemente, junto con otras levaduras como *Candida valida*, fue la causante de la formación de película a partir del séptimo día de fermentación. Ha sido aislada del aire, de alimentos convencionales y de bebidas tradicionales como el pulque, el pozol y el tesgüino tarahumara hecho con granos de maíz (Ulloa et al., 1987; Lappe y Ulloa 1989; Calderón y Herrera, 1989).

*Candida valida* (Leberle) van Uden et Buckley. Es el estado asexual de *Pichia membranaefaciens*. Es una levadura predominantemente oxidativa y formadora de película. Ha sido aislada de algunas bebidas tradicionales de México, como pulque, tesgüino, colonche y tepache (Ulloa y Herrera, 1976-1982; Kreger van Rij, 1984). La presencia de *C. valida* había sido reportada anteriormente por Armijo et al. (1991), quienes la

aislaron de cultivos de tibicos que tenían como sustrato piloncillo y melaza, así como de la película pulverulenta formada en la superficie de cultivos de tibicos en solución de melaza.

*Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner var *albidus*. Levadura predominantemente oxidativa. Se considera como patógeno oportunista (Barnett et al., 1979; Kreger van Rij, 1981, en Lappe y Ulloa, 1989). Se ha reportado en tesgüino tarahumara (Lappe y Ulloa, 1989).

*Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder. Levadura con metabolismo oxidativo que se ha encontrado en ambientes marinos, aire, suelo, larvas de insecto y en algunas bebidas fermentadas mexicanas como el tesgüino (Lappe y Ulloa, 1989) y el pulque (Lappe, et al., 1989).

*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. Esta levadura es capaz de producir etanol como resultado de su metabolismo. A esta especie se le considera como una levadura fermentadora por excelencia, de mayor distribución en las bebidas fermentadas del mundo. Ha sido aislada de todas las bebidas fermentadas indígenas de México estudiadas hasta hoy, como el pozol, el tesgüino, el pulque, el colonche, el tepache de tibicos y la tuba (Estrada-Cuéllar, 1985; Ulloa et al., 1987; Lappe y Ulloa, 1989; Lappe et al, 1989; Herrera y Ulloa, 1979).

Las características taxonómicas distintivas de las especies de levaduras aisladas en este trabajo se resumen en los cuadros 5 a 8.

#### 6.2.2. BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS

En la Figura 9 se registraron los cambios ocurridos en las poblaciones de bacterias mesófilas aerobias durante ambas fermentaciones. Se observa que durante las primeras horas de fermentación hubo un incremento en las poblaciones de bacterias, alcanzando un valor máximo a las 24 horas en la primera fermentación, con  $5.6 \times 10^7$  ufc/ml., en la segunda fermentación a las 48 horas con  $6.0 \times 10^7$  ufc/ml. En las horas siguientes las poblaciones se mantuvieron relativamente constantes hasta el final del proceso fermentativo.

La mayoría de las especies de bacterias encontradas se ubicaron dentro del género *Bacillus* que se caracterizaban por ser formadoras de esporas, anaerobias facultativas o estrictamente aerobias y Gram + Son organismos sapróbios que generalmente se encuentran en el suelo o agua y algunos pueden llegar a ser patógenos para animales y el hombre (Singleton P. et al., 1986) (Fig. 10).



A continuación se describen las características distintivas de cada especie identificada:

1). BACILOS

*Bacillus brevis* Migula (Fig. L ). Es una bacteria aerobia que produce ácido de glucosa. Ha sido aislada del suelo y de algunos alimentos convencionales (Harrigan y Mc Cance, 1976).

*Bacillus polymyxa* (Prazmowski) Macé (Fig. M ). Bacteria facultativa y metabólicamente activa que puede crecer vigorosamente en presencia de carbohidratos fermentables y en anaerobiosis. Al fermentar glucosa produce etanol, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> es apta para descomponer pectinas y polisacáridos del tejido de las plantas, pero su acción sobre celulosa es débil. Es capaz de fijar nitrógeno en condiciones anaerobias y de sintetizar la polimixina, que es una cadena de polipéptidos que se utiliza como antibiótico contra bacterias Gram -. Ha sido aislada de vegetales en descomposición, algunas cremas medicadas y antiácidos (Claus et al., 1986; Stanier et al., 1986; Kingsbury, 1989).

*Bacillus circulans* Jordan (Fig. Ñ ). Es una bacteria anaerobia facultativa, que fermenta carbohidratos y posee acción proteolítica. Poduce un grupo de polipéptidos llamados circulinas, que son antibióticos

estrechamente relacionados, en estructura y actividad, con las polimixinas. Se ha aislado principalmente del suelo (Claus D. et al., 1986; Stanier et al., 1986; Kingsbury, 1989).

*Bacillus coagulans* Hammer. Es una bacteria anaerobia facultativa, fermentadora, cuyos productos principales de la fermentación son L (+) ácido láctico y, en menor cantidad, ácido acético, etanol y acetoina. Se ha encontrado en suelo y en alimentos ácidos como jugos de tomate y ensilados (Claus, 1986; Stainer, 1986; Kingsbury, 1989).

*Bacillus firmus* Bredmann et Werner (Fig. P). Es una bacteria oxidativa que puede formar ácido a partir de glucosa, crece a pH bajos y para su crecimiento requiere una serie de aminoácidos. Ha sido aislada principalmente del suelo y de pantanos salobres (Bergey et al., 1986; Stanier, 1986).

*Bacillus macerans* Schardinger (Fig. N ). Es una bacteria anaerobia facultativa, mucoide, opaca, cuyos productos de fermentación son etanol, acetona, ácido fórmico y acético, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Descompone pectinas y polisacáridos del tejido de las plantas, pudiendo actuar también sobre celulosa. Produce dextranas cíclicas de almidón o glucógeno por acción de una enzima extracelular que contiene 6, 7 u 8 cadenas  $\alpha$  (1-4) y

residuos de D-glucosa, conocidos respectivamente como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -dextranas. También es capaz de fijar nitrógeno atmosférico. Se ha encontrado en suelo, plantas y frutos (Claus et al., 1986; Stanier et al., 1986; Kingsbury, 1989).

*Bacillus pumilus* Meyer et Gottheil (Fig. 0). Es una bacteria aerobia que en medio sólido se observa como una colonia lisa y opaca, de color amarillento debido a la presencia de melaninas en su interior. Ha sido aislada del suelo y del aire (Claus et al., 1986; Stanier et al., 1986).

## 2). ENTEROBACTERIAS

Durante la primera fermentación se observó un incremento en las cuentas de enterobacterias, principalmente en el transcurso de las primeras 24 horas de fermentación, aumentando paulatinamente de  $2.3 \times 10^2$  ufc/ml inicial a  $5.6 \times 10^3$  ufc/ml (Figura 11). Posteriormente se presentó un descenso poblacional, quizá debido a las condiciones de acidez predominantes en el sustrato. A las 168 horas se observó otro incremento ( $5.1 \times 10^3$  ufc/ml). Durante la segunda fermentación no se encontraron enterobacterias.

Las enterobacterias aisladas fueron identificadas como *Enterobacter aerogenes*, la cual es una bacteria Gram -, anaerobia facultativa, con metabolismo

respiratorio y fermentativo, catalasa + y productora de gas (en glicerol, inositol y adonitol); produce pigmento amarillo, oxidasa -, presenta movilidad, lisina +, producción de ácido de glucosa, acetoina + e hidrólisis de esculina. Es común en suelo, agua, plantas y algunas veces aparece en el tracto intestinal o respiratorio. Se distingue de otras bacterias similares, por su inmovilidad y por la presencia de cápsula. Una propiedad bioquímica que distingue a algunas de las cepas de *E. aerogenes* de otras enterobacterias es la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, propiedad que sólo se manifiesta en condiciones anaerobias de crecimiento, ya que la nitrogenasa de estas bacterias se inhibe rápidamente por la presencia de O<sub>2</sub> (Claus et al., 1986; Stanier et al., 1986; Kingsbury, 1989).

Durante la fermentación se observó un efecto antagónico por parte de las fijadoras de nitrógeno sobre las levaduras en la primera fermentación. Estos resultados pueden relacionarse con los obtenidos por Aguilera (1989), quien reportó que durante la fermentación de pozol inoculado con la bacteria fijadora de nitrógeno *Agrobacterium azotophilum* (Ulloa y Herrera 1972), se presentó un antagonismo de esta bacteria contra varias especies de bacterias, levaduras y mohos. Por ello se considera que sería interesante estudiar el

efecto antagónico de *E. aerogenes* sobre diversos microorganismos y así verificar el comportamiento microbiano observado en este proceso fermentativo.

### 3). BACTERIAS LÁCTICAS

En la figura 12 se representan los cambios en las poblaciones de bacterias lácticas, mismas que presentan una cuenta inicial de  $4.6 \times 10^4$  ufc/ml en la primera fermentación, y de  $5.2 \times 10^4$  ufc/ml en la segunda. Posteriormente se observó un incremento poblacional durante las primeras 24 horas de fermentación, alcanzando en este tiempo el máximo valor, que fue de  $6.7 \times 10^4$  ufc/ml para la primera fermentación, y  $6.6 \times 10^4$  ufc/ml para la segunda. Sin embargo, durante el resto del proceso fermentativo se observó un decremento quizá debido a las condiciones de acidez imperantes o a la competencia con otros microorganismos por el sustrato. Aun así, es importante mencionar que las bacterias lácticas persistieron durante todo el proceso fermentativo, y probablemente fueron las responsables de la producción de ácidos (láctico y acético) acumulados en el sustrato de fermentación.

Es importante señalar que las bacterias lácticas no fueron identificadas hasta especie sino que sólo se clasificaron grupalmente en homo y heterolácticas de

acuerdo a su metabolismo fermentativo (ver Fig. 13 ). De ellas, cuatro cepas resultaron ser homolácticas y tres heterolácticas.

La presencia de bacterias productoras de antibióticos contra bacterias Gram - (*B. polymyxa* y *B. circulans*), así como las bacterias productoras de ácidos a partir de glucosa como: *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans* y las bacterias homo y heterolácticas (que quizá pudieron ser capaces de acidificar el sustrato durante la fermentación) debieron provocar que el sustrato fuese intolerable para microorganismos patógenos, asegurando la calidad higiénica del producto.

Cabe mencionar que la presencia de la bacteria *B. macerans* debió haber contribuido a la viscosidad del sustrato, por su capacidad de producir dextranas. Además, las bacterias *B. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. macerans* y *B. circulans*, así como las bacterias heterolácticas, pudieron ser las responsables del contenido de etanol en el sustrato, principalmete durante las primeras 96 horas de fermentación.

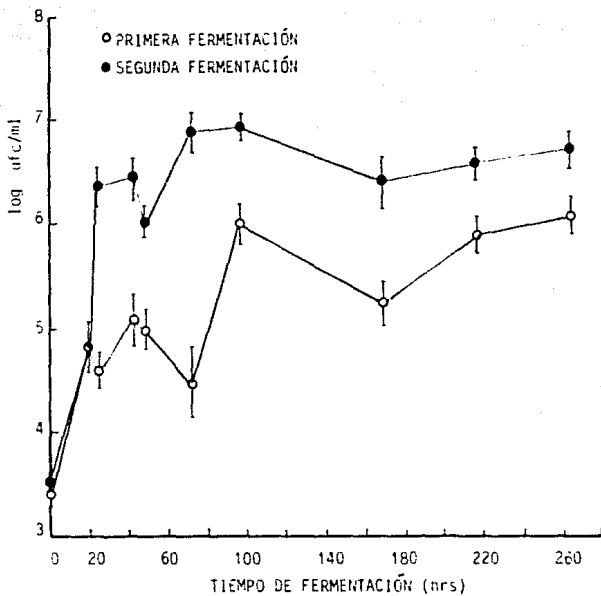


Figura 4. Sucesión de las poblaciones totales de levaduras durante los dos procesos de fermentación en soluciones estériles de piloncillo inoculadas con tибicos.

Cuadro 5. Características morfológicas de las especies de levaduras estudiadas.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cryptosporidium albicans</i> <i>var. albicans</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<b>A) MACROMORFOLOGÍA</b>			
1. CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO (GELP)	Sedimento abundante	Sedimento escaso con coque sucrosos	Sedimento escaso y rosado
2. CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO (GELPA)	Colonia plana, de 3.3 cm de diámetro a los 30 días, blanca a rosada, lisa, brillante, opaca, de margen ondulada con surcos radiales, arena aferrada (Fig.A)	Colonia de aproximadamente 2.5 cm de diámetro a los 30 días, umbonada, de color amarillo brillante, arena, óxido, con borde ondulada (Fig.C)	Colonia de aproximadamente 3.5 cm de diámetro a los 30 días, de color coral brillante, umbonada, rosada, con surcos radiales y borde labado (Fig.E)
<b>B) MICROMORFOLOGÍA</b>			
1. CARACTERÍSTICAS DE LA REPRODUCCIÓN ASEJUAL O VEGETATIVA (AMI, GELPA, HMA)	Germinación multilateral	Germinación unilaberal (Fig.B)	Germinación multilateral
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS VEGETATIVAS			
A) Morfología en medio ácido (GELPA)	Células globosas, de 4.32 a 5.69 $\mu$ m de diámetro, simples, en pares o cadenas cortas (Fig.B)	Células ovaladas, de 3.5 a 5.4 $\mu$ m (Fig.B)	Células globosas o ovaladas, de 2.5 a 4.5 x 4.5 a 6.5 $\mu$ m
B) Formación de pseudomicelio en placa de Dubosq (HMA)	Sudmicelio rudimentario tanto en ascaros como en ascarinias	Ausente	Sudmicelio rudimentario o ausente
3. CARACTERÍSTICAS DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL (GELPA, AMI, FW, GRA)			
A) Proceso de formación de ascas y ascosporas	Directamente de las células vegetativas (Fig.B)	Ausente	Ausente
B) Características de las ascas y ascosporas. Situación del ascó	Libre y de pared persistente		
C) Forma y medida del ascó	Esférico, de 4.2 a 8.4 $\mu$ m de diámetro		
D) Número de ascosporas por ascó	Una a cuatro		
E) Forma y medida de las ascosporas	Esféricas de 2.16 a 4 $\mu$ m de diámetro		

AML Agar para morfología de levaduras; GELPA Glucosa extracto de levadura peptona agar; HMA Harina de malt agar; FW Fowel agar; GRA Gorodkova agar



Cuadro 6. Características morfológicas de las especies de levaduras estudiadas.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	<i>Brettanomyces clausenii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida rubida</i>
<b>A) MACROMORFOLOGÍA</b>			
1. CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO (GELP)	Sedimento abundante, con película delgada en la superficie	Sedimento abundante, con aulita azucarada	Sedimento abundante, película opaca y delgada
2. CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO (GELPA)	Colonia de aprox. 3 cm de diámetro a los 30 días, blanca, cremosa, opaca, cresta abombada con proyecciones gruesas, borde fibrinado, surcos radiales poco evidentes, olor ácido característico. Las células tienden a crecer bajo el medio (Fig. V)	Colonia de aprox. 3.5 cm de diámetro a los 30 días, de color blanco brillante, cresta abombada, borde liso y undulante. Surcos radiales poco evidentes (Fig. I)	Colonia de aprox. 3.2 cm de diámetro a los 30 días, blanca, cremosa, opaca, de borde liso, con surcos radiales poco marcados (Fig. F)
<b>B) MICROMORFOLOGÍA</b>			
1. CARACTERÍSTICAS DE LA REPRODUCCIÓN ASEJUAL O VEGETATIVA (AML, GELPA, HM4)	Germinación multi lateral	Germinación multi lateral	Germinación multi lateral (Fig. H)
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS VEGETATIVAS			
A) Morfología en medio sólido (GELPA)	Células ovoidales o alargadas, de $2 \times 6.5 \times 3.5 \times 11.2 \mu\text{m}$ , simples, en pares o pequeñas cadenas	Células ovoides o alargadas, de $1.5 \times 4.8 \times 2 \times 15 \mu\text{m}$	Células ovoides o alargadas, de $4 \times 7.4 \times 4 \times 5 \mu\text{m}$ (Fig. B)
B) Formación de pseudomicelio en placa de Dextrosa (HM4)	Pseudomicelio rudimentario, más abundante en anaerobiosis que en aerobiosis (Fig. K)	Pseudomicelio desarrollado tanto en aerobiosis como en anaerobiosis	Pseudomicelio bien desarrollado tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, constituido por pseudohifas ramificadas (Fig. G)
3. CARACTERÍSTICAS DE LA REPRODUCCIÓN SEXUAL (GELPA, AML, FW, GKA)	Asexual	Asexual	Asexual

AML Agar para morfología de levaduras; GELPA Glucosa extracto de levadura peptona agar; HMAHarina de malz agar; FW Fowel agar; GKA Gorodkova agar

Cuadro 7. Características fisiológicas y bioquímicas de las especies de levaduras estudiadas.

Compuestos de Cuthono	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>C. valida</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
Galactosa	+	-	+
Sacarosa	+	-	+
Maltosa	+	-	+
Cellobiosa	+	-	+
Trehalosa	+	-	+
Lactosa	-	-	-
Rafinosa	+	-	+
Almidón Sol.	-	-	-
D-Xilosa	+	-	+
L-Arabinosa	+	-	+
D-Ribosa	+	-	+
L-Ramnosa	+	-	+
Eritritol	-	-	-
Ribitol	+	-	-
D-Manitol	+	-	-
Ac. Succinico	+	+	+
Ac. Citrico	+	-	+
Inositol	-	-	-
Melibiosa	+	-	-
Melicetosa	+	-	+
L-Sorbosa	+	-	-
D-Arabinosa	+	-	-
Glucitol	+	-	-
Salicina	+	-	-
Ac. lactico	nd	+	-
ENG <sub>1</sub>	-	-	-
MLV	+	-	+
37°C	-	+	+
50% GELPA	-	-	+
Nitrato	-	-	-

d = débil

MLV = medio libre de vitaminas

Cuadro 8. Características fisiológicas y bioquímicas de las especies de levaduras estudiadas.

Compuestos de Carbono	<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Brettanomyces clausenii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Galactosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Cesobiosa	+	+	-
Trehalosa	+	+	+
Lactosa	-	+	-
Rafinosa	+(d)	+(d)	+
Almidón Sol.	-	-	-
D-Xilosa	+(d)	-	-
L-Arabinosa	+(d)	-	-
D-Ribosa	-	-	-
L-Ramnosa	+(d)	-	-
Eritritol	-	-	-
Ribitol	+(d)	-	-
D-Manitol	-	-	-
Ac. Succínico	+	-	-
Ac. Cítrico	+	-	-
Inositol	+	-	-
cellobiosa	-	-	-
Melicitosa	-	-	-
Nitrato	+	+(d)	-
MLV	-	-	+
50% GELPA	-	-	+
37°C	+	+	+
Ac. de Glucosa	+	+	-
KNO <sub>3</sub>	+	-	-

d = débil

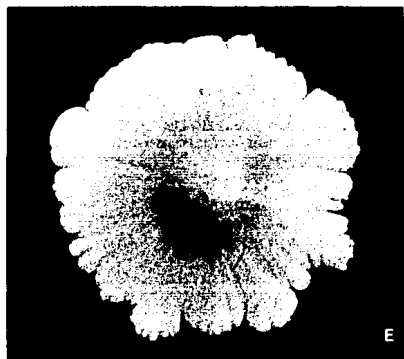
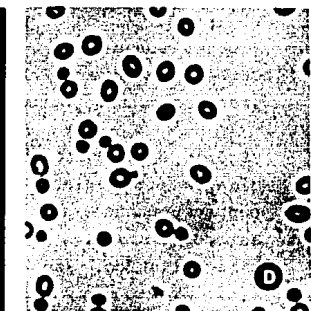
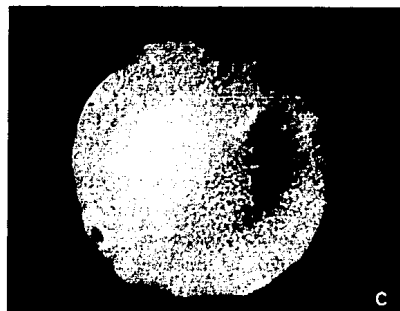
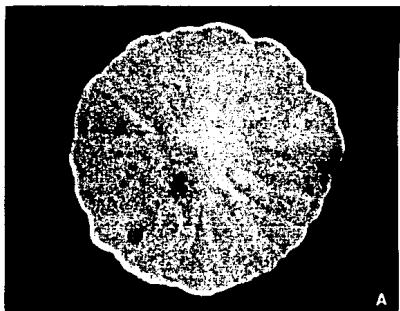
MLV = medio libre de vitaminas

Figuras A-K. Levaduras aisladas durante el proceso de fermentación en sustratos líquidos estériles de piloncillo inoculados con tibicos.

Figuras A-B. *Saccharomyces cerevisiae*. Fig. A. Colonia gigante sobre placa de GELPA: de color blanco a pardo, plana, lisa, opaca, de borde ondulado con surcos radiales, olor afrutado, x 1.25. Fig. B. Ascas oblongas, libres, persistentes, con tres o cuatro ascosporas globosas, x 1200.

Figuras C-D. *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Fig. C. Colonia gigante sobre placa de GELPA: color amarillo rosado, brillante, suave, mucoide, umbonada y con borde continuo, x 1.20. Fig. D. Células vegetativas globosas a ovaladas, solitarias o en pares, gemación multilateral, x 750.

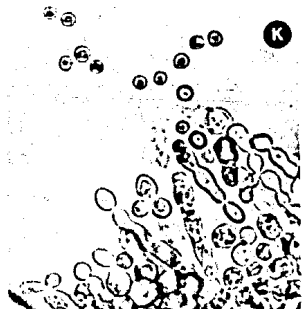
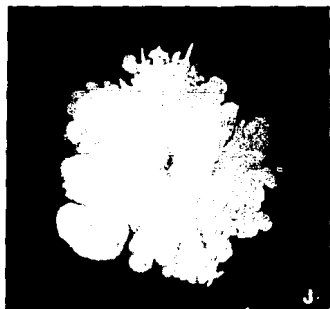
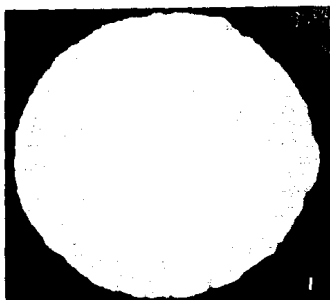
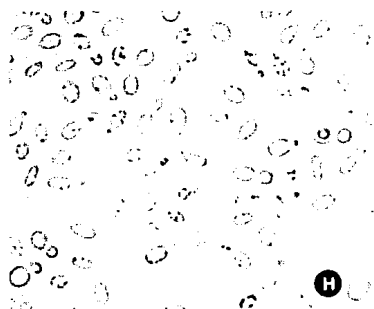
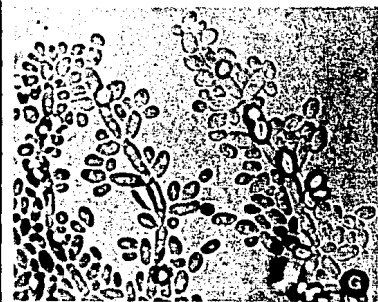
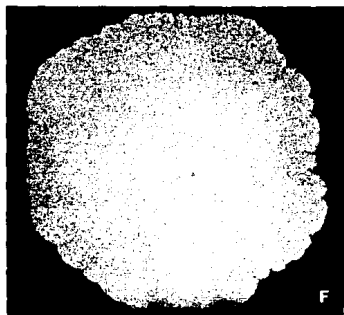
Figura E. Colonia gigante de *Rhodotorula rubra* sobre placa de GELPA: color coral, brillante, umbonada, mucoide, con surcos radiales y borde lobado. x 1.50.



Figuras F- H. *Candida valida* (estado asexual de *Pichia membranaefaciens*) Fig. F. Colonia gigante en placa de GELPA: blanca, cremosa, opaca, borde liso con surcos radiales poco marcados, con olor afrutado, x 1.35. Fig. G. Seudomicelio bien desarrollado en placa de Dalmau, tanto en condiciones anaerobias como aerobias, constituidos por pseudohifas ramificadas y cadenas de blastosporas, x 850. Fig. H. Células vegetativas ovoides a elipsoidales, solitarias, en pares o en cadenas cortas, gemación multilateral, x 750.

Figura I. Colonia gigante de *Candida guilliermondii* (estado asexual de *Pichia guilliermondii*) en placa de GELPA: crecimiento vigoroso, blanca, brillante, borde liso y ondulado, surcos radiales poco evidentes. x 1.40.

Figuras J-K. *Brettanomyces claussenii*. Fig. J. Colonia gigante sobre placa de GELPA: blanca, cremosa, opaca, centro umbonado, con pequeños grumos, borde fimbriado, surcos radiales poco evidentes, olor ácido característico, las orillas tienden a crecer bajo el medio de cultivo, x 1.20. Fig. K. Células vegetativas, ovaladas, elipsoidales, solitarias, en pares o en cadenas cortas y pseudomicelio rudimentario constituido por cadenas de células o células elongadas ramificadas, en placa de Dalmau, x 1000.



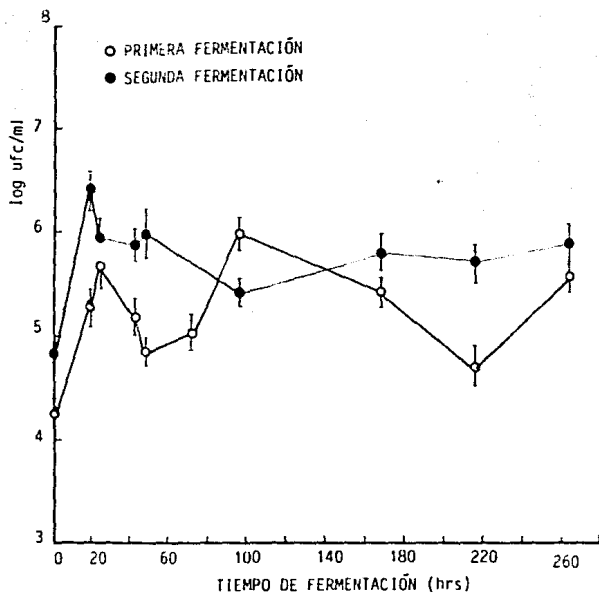
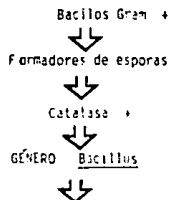


Figura 9. Sucesión de las poblaciones totales de mesófilos aerobios durante los dos procesos de fermentación en soluciones estériles de piloncillo inoculadas con tibicos.





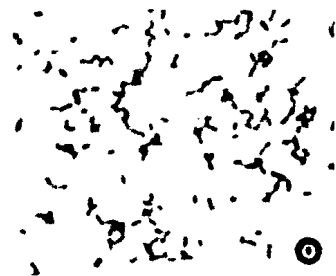
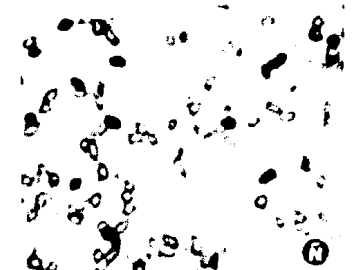
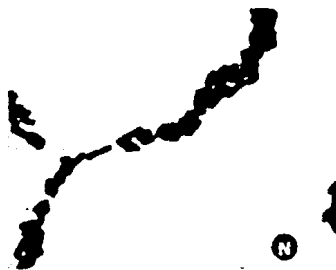
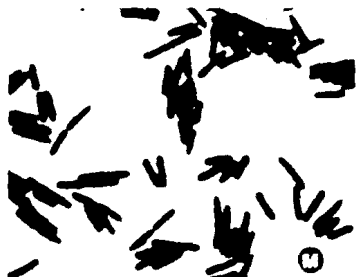
PRUEBAS	<i>B. pumilus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. megaterius</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. brevis</i>
ÁCIDO	+	+(d)	+	+	+	+(d)	-
GAS	-	-	+	+	-	-	-
ACETOINA	+	-	+	-	-	-	-
HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN	-	+	+	+	+	+	-
ANAEROBIOSIS	-	-	+	+	+(d)	+	-
TEMPERATURA DE CRECIM.	5-55°C	5-45°C	5-45°C	5-50°C	5-50°C	15-60°C	10-60°C
HIDRÓLISIS DE CASEÍNA	+	+	+	-	+(d)	+	+
MOVILIDAD	+	+(d)	+	+	+(d)	+	+
INDOL	-	+	+	+	-	+(d)	+(d)

(d)= débil.

Figura 10. Pruebas para la identificación de mesófilos aerobios aislados durante los procesos de fermentación en sustrato estéril de piloncillo inoculado con tибicos.

Figuras L-P. células vegetativas, Gram +, de diversas especies de *Bacillus* aislados durante el proceso de fermentación, en sustratos estériles de soluciones de piloncillo inoculados con tибicos.

Fig. L. *Bacillus brevis*: Células separadas con forma bacilar, x 1600. Fig. M. *Bacillus polymyxa*: Estreptobacilos en empalizada, x 2000. Fig. N. *Bacillus macerans*: Bacilos cortos inmersos en polímero, x 750. Fig. Ñ. *Bacillus circulans*: Células de forma bacilar, x 1600. Fig. O. *Bacillus pumilus*: Bacilos cortos x 1600. Fig. P. *Bacillus firmus*: Células en forma de bacilos largos, x 1660.



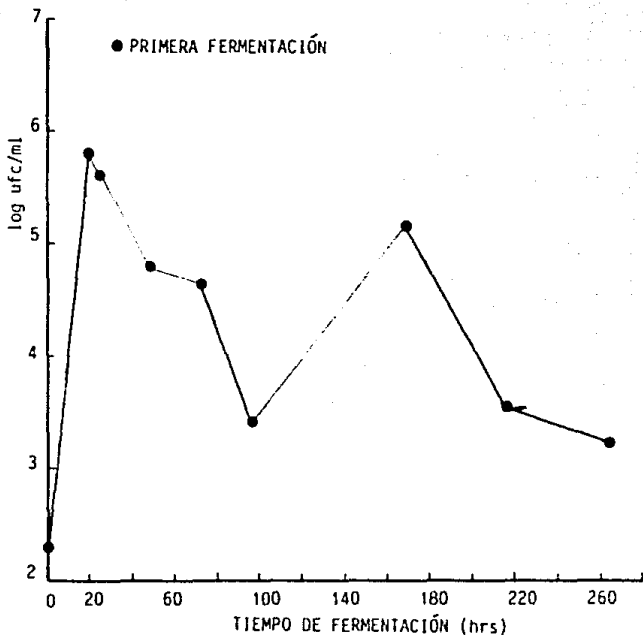


Figura 11. Sucesión de las poblaciones totales de enterobacterias durante el primer proceso de fermentación de soluciones estériles de piloncillo inoculadas con tíficos.

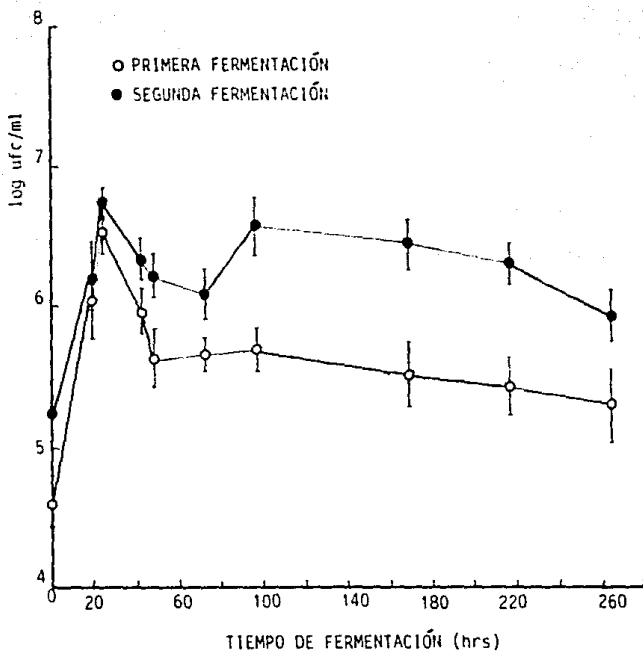


Figura 12. Sucesión de las poblaciones totales de bacterias lácticas durante los dos procesos de fermentación en soluciones estériles de piconcillo inoculadas con tибicos.

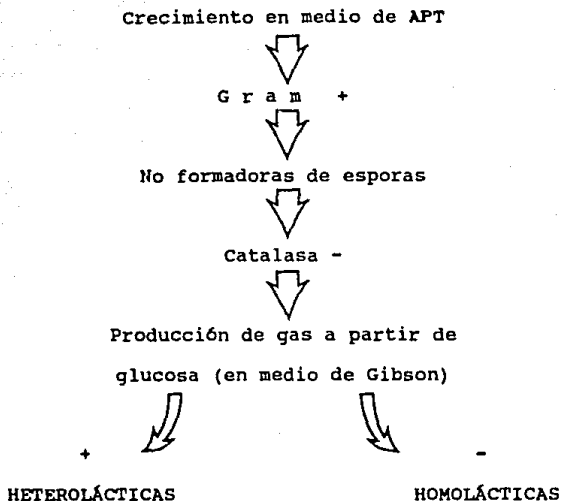


Figura. 13 . Diagrama utilizado para la identificación de bacterias lácticas presentes en el sustrato líquido de piloncillo durante el proceso de fermentación.

### 6.3. ANALISIS BIOQUIMICOS

#### 6.3.1. pH

La Figura 14 representa los cambios de pH ocurridos en las dos fermentaciones realizadas. En dicha gráfica se puede observar un comportamiento muy semejante en ambos casos. En el transcurso de las primeras 24 horas el pH descendió bruscamente desde un valor inicial de 6.5, para la primera fermentación, y de 6 para la segunda, hasta alcanzar un valor de 3.4 en ambas fermentaciones. De las 24 a las 72 horas, el decremento de pH no fue tan súbito como en un principio (3.4 a 3.0). A partir de las 96 horas y hasta el tiempo final de la fermentación (264 horas) el pH se mantuvo constante, con valores que oscilaron entre 3.0 y 2.8 en las dos fermentaciones.

Durante las fermentaciones se encontraron presentes diversos microorganismos productores de ácidos, como son bacterias homo y heterolácticas, enterobacterias, Bacillus y levaduras, mismos que fueron responsables de la acidificación del sustrato, sobre todo durante las primeras horas de fermentación.

#### 6.3.2. ACIDEZ TITULABLE

Como se puede apreciar en la Figura 15 el incremento en la acidez de ambas fermentaciones fue muy semejante.

En las primeras 19 horas de fermentación se presentó un incremento poco evidente en la acidez del sustrato (expresado como ácido láctico), que fue de 0 a 0.05%, mientras que de las 24 a las 72 horas ocurrió un incremento súbito en la acidez, de 0.08% a 0.37%. Durante las horas siguientes continuó aumentando hasta que a las 216 horas de fermentación se detectó el valor máximo, que fue de 1.3% para la primera fermentación, y de 1.26% para la segunda. De las 216 a las 264 horas de fermentación ya no se observó incremento alguno en ambas fermentaciones.

En el transcurso de las fermentaciones se presentaron pequeñas variaciones en la acidez del sustrato, lo cual pudo deberse al consumo y producción de ácidos como resultado del metabolismo de la microbiota presente en el sustrato. Como se dijo anteriormente, en ambas fermentaciones se encontraron involucradas bacterias homolácticas, que principalmente producen ácido láctico a partir de glucosa; bacterias heterolácticas, que producen ácido láctico y acético, entre otros productos, y diferentes especies de levaduras que son capaces de producir ácido acético a partir de alcohol.



El incremento en la acidez del medio durante la fermentación pudo ser una de las causas de la inhibición en el crecimiento de algunos microorganismos al final del proceso fermentativo, ya que no todos los microorganismos son capaces de soportar tales condiciones de acidez.

### 6.3.3. CARBOHIDRATOS TOTALES

Se determinó la concentración de carbohidratos totales en el transcurso de ambas fermentaciones, como se muestra en la figura 16 . Se observó un decremento, desde una concentración de 31.8 a 26 mg/ml en la primera fermentación, y de 45 a 29.6 mg/ml en la segunda fermentación. En la misma gráfica se pueden observar dos fases de consumo de carbohidratos totales; la primera fue de las 0 a las 96 horas, lapso en el que el consumo fue más rápido, disminuyendo hasta una concentración de 31.8 mg/ml en ambas fermentaciones. La segunda fase correspondió al intervalo entre las 96 y las 264 horas, donde ocurrió un consumo moderado de carbohidratos, obteniendo una concentración de 26 mg/ml para la primera fermentación, y de 29.6 mg/ml para la segunda, lo que representa un consumo de poco más de la mitad de la concentración inicial (45 mg/ml) de carbohidratos solubles totales contenidos en el sustrato.

Lo observado en esta gráfica se puede relacionar con el comportamiento microbiano manifestado durante el proceso fermentativo. La primera etapa de consumo rápido de carbohidratos coincide con el periodo en el que los grupos microbianos cuantificados se encuentran en pleno desarrollo. En la segunda fase el consumo de carbohidratos fue más lento debido a las condiciones adversas que adquirió el medio, como son el pH bajo y las concentraciones de sustancias tóxicas (ácidos orgánicos) que influyeron directamente sobre las poblaciones microbianas presentes en el sustrato.

Sin embargo, no todos los carbohidratos fueren consumidos durante las 264 horas de fermentación, por lo que resultaría interesante continuar la cinética de fermentación por más tiempo, con la finalidad de determinar lo que ocurre tanto bioquímica como microbiológicamente al final del proceso, hasta agotarse los carbohidratos, o si los microorganismos son capaces de soportar esas condiciones.

#### 6.3.4. CARBOHIDRATOS REDUCTORES

Los valores obtenidos durante ambos procesos de fermentación se presentan en la Figura 17. El contenido inicial de carbohidratos reductores es de 5.8 mg/ml para

contenido máximo se presentó a las 216 horas en la primera fermentación, con 0.76 mg/ml, y en la segunda fermentación a las 264 horas, con una concentración de 0.84 mg/ml de proteína soluble. Este incremento se explica principalmente por el aumento de biomasa microbiana ocurrida durante el tiempo de fermentación, aunque, como se indicó anteriormente, en ambas fermentaciones se aislaron e identificaron varios tipos de microorganismos, reportados como anaerobios facultativos, capaces de fijar nitrógeno, como son *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus polymyxa*, y *Bacillus macerans*, los que pudieron contribuir al aumento de proteína del sustrato en el transcurso de ambos procesos.

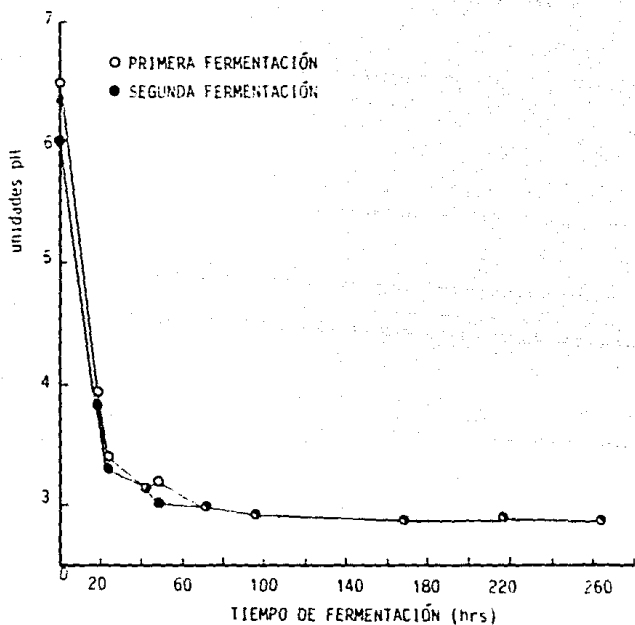


Figura 14. Cambios de pH ocurridos durante los dos procesos de fermentación en sustratos líquidos de piloncillo estériles, inoculados con tибicos.

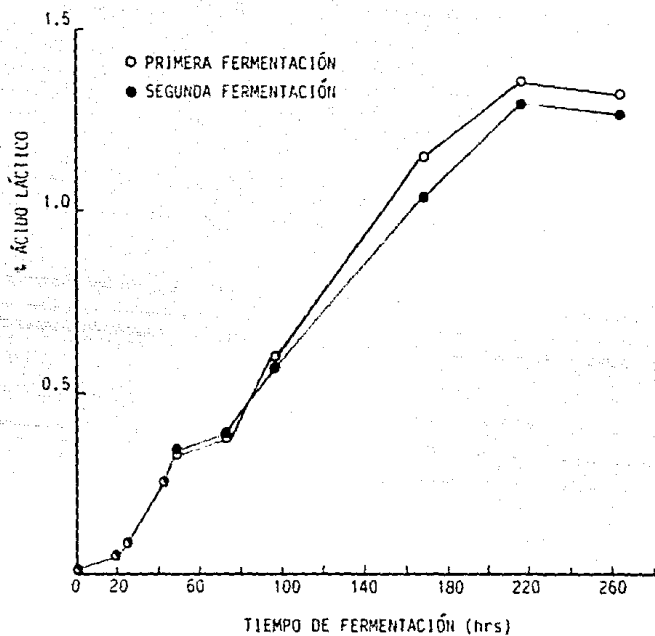


Figura 15. Cambios en la acidez del sustrato, expresada como ácido láctico, en el transcurso de ambas fermentaciones

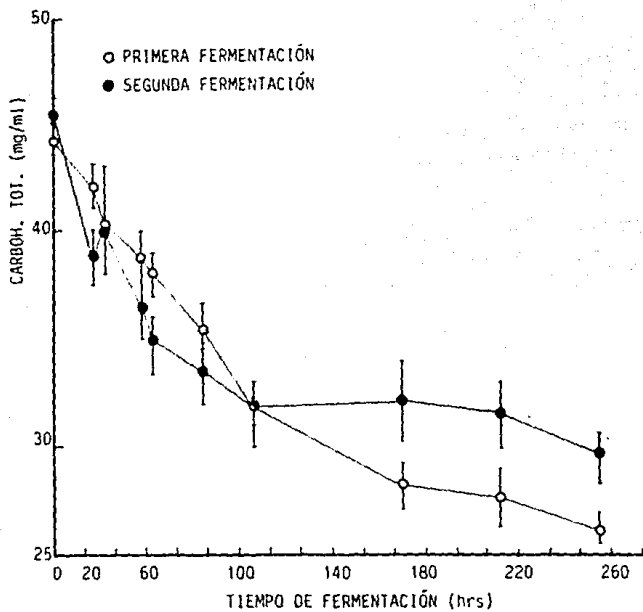


Figura 16. Cambios en el contenido de carbohidratos totales registrados durante los diferentes tiempos de fermentación del líquido de piloncillo estéril, inoculado con tибicos.

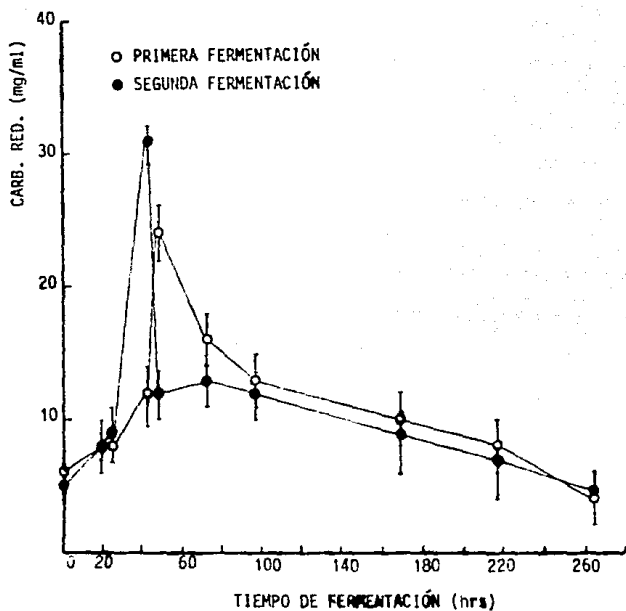


Figura 17. Cambios en el contenido de carbohidratos reductores registrados durante los diferentes tiempos de fermentación del líquido de piloncillo estéril inoculado con tибicos.

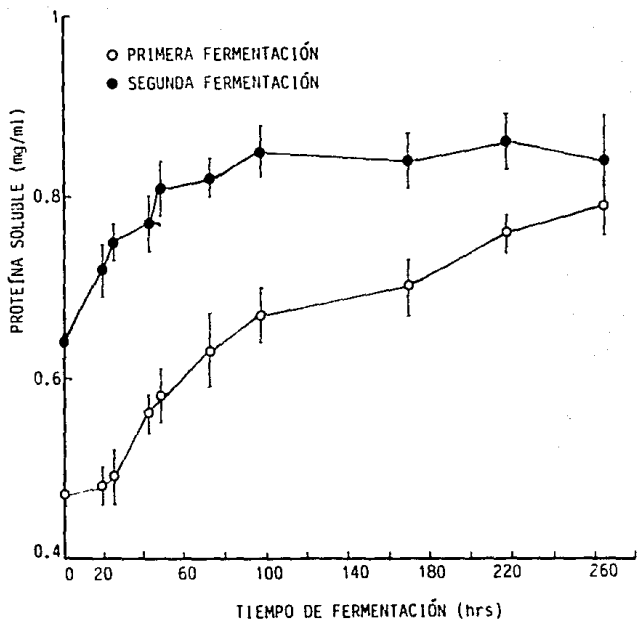


Figura 18. Cambios en el contenido de proteína soluble registrados durante los diferentes tiempos de fermentación del líquido de piloncillo estéril, inoculado con tibicos.



## 6.4. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

### 6.4.1. ÁCIDO LÁCTICO

Tomando en cuenta que durante la fermentación se encontraron diferentes bacterias lácticas (tanto homo como heterolácticas) capaces de sintetizar ácido láctico a partir de compuestos de carbono, es posible correlacionar los resultados obtenidos en la cuantificación de dichas bacterias con los cambios ocurridos en la concentración de ácido láctico durante ambos procesos fermentativos. Como se puede observar en la figura 19 , el ácido láctico aumentó notablemente durante las primeras 24 horas de fermentación, alcanzando su mayor concentración a las 42 horas ( 0.59 mg/ml de ácido láctico en la primera fermentación, y 0.51 mg/ml en la segunda). En este tiempo se desarrollaron activamente las poblaciones de bacterias lácticas. Posteriormente el ácido láctico decreció, debido probablemente al consumo de este ácido por parte de algunos microorganismos.

Cabe mencionar que la presencia de este ácido en una fermentación es sumamente importante porque inhibe el desarrollo de microorganismos perjudiciales o patógenos al aumentar la acidez y disminuir el pH del sustrato en el que se encuentran. Además, debido a que el ácido

láctico es utilizado por el cuerpo humano en la síntesis de glucosa (Lehninger,1985), le confiere a la bebida un valor nutricional, en ocasiones mejora su sabor y actúa como conservador ( Lappe y Ulloa, 1989).

#### 6.4.2. ETANOL

Durante las primeras 96 horas de ambos procesos fermentativos, el contenido de etanol aumentó de una concentración inicial de 0.02 mg/ml en la primera fermentación, y de 0.04 mg/ml en la segunda, hasta una concentración de 0.18 mg/ml en la primera fermentación, y de 0.12 mg/ml en la segunda ( Figura 20 ). Posteriormente, de las 96 a las 168 horas del proceso se presentó un decremento súbito, hasta alcanzar una concentración de 0.12 mg/ml en la primera fermentación, y de 0.09 mg/ml en la segunda, misma que se mantuvo relativamente constante hasta el final de la fermentación. Cabe mencionar que el decremento en la concentración de etanol coincidió con el incremento en el contenido de ácido acético (Fig. 21 ).

La producción de etanol puede atribuirse principalmente a la presencia de levaduras fermentadoras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii* y *Brettanomyces claussenii*) y bacterias heterolácticas,

pues son microorganismos capaces de elaborar etanol a partir de fuentes de carbono. Es importante mencionar que el etanol puede actuar como conservador de la bebida fermentada, además de que el etanol no sólo debe ser considerado como un estimulante, sino también como una fuente inmediata de calorías.

#### 6.4.3. ÁCIDO ACÉTICO

Al inicio de ambos procesos se registraron pequeñas concentraciones de ácido acético, con una tendencia a aumentar durante el tiempo de fermentación y presentando ligeras variaciones (Fig. 21 ). A las 168 horas se detectó la máxima concentración de dicho ácido que fue de 0.30 mg/ml en la primera fermentación, y de 0.26 mg/ml en la segunda, posteriormente ocurrió un leve descenso en su contenido. Si se comparan los resultados obtenidos para la concentración de etanol (Fig. 20 ) con los de ácido acético se puede observar que cuando ocurre un incremento en el contenido del segundo entonces se presenta un decremento en el del primero. En la fase final de la fermentación ocurre un descenso en la concentración tanto de ácido láctico (Fig. 19 ) como de etanol, mientras que en dicha fase el contenido de ácido acético se incrementa notablemente.

El ácido acético cuantificado en ambas fermentaciones pudo ser elaborado por bacterias heterolácticas, así como por la levadura *B. clausenii*. Dichos microorganismos son capaces de producir ácido acético como metabolito final a partir de glucosa. Al acumularse este metabolito en el sustrato lo acidifica y le confiere un sabor acre (Lappe y Ulloa, 1989). El ácido acético presenta un efecto inhibitorio mayor que el del ácido láctico (Aguilera, 1989), y al igual que éste ácido láctico y el etanol, actúa como conservador del sustrato fermentado (Lappe y Ulloa, 1989). De acuerdo a los estudios que se tienen sobre tónicos en sustrato de piloncillo, se ha reportado la presencia de una película blanca y gruesa (Armijo, 1990), semejante a la "madre del vinagre" (formada después de un mes de fermentación).

La madre de vinagre está compuesta por una matriz de celulosa que es sintetizada por la bacteria acética *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* (Hibbert, 1931; Hestrin, 1954. Sin embargo, en este trabajo no se detectó la presencia de dicha bacteria acética en el sustrato, que pudiese ser capaz de formar una nata gruesa de celulosa, quizá porque el tiempo de fermentación fue sólo de dos semanas. Además se ha reportado que *A. aceti* subespecie *xylinum* proviene

principalmente del aire y para su crecimiento requiere de una buena aireación (Steinkraus, 1977). Debido a que los matraces fueron tapados con torundas de algodón se evitó la entrada de microorganismos del exterior al sustrato. Aunque no se utilizaron medios selectivos para *Acetobacter*, cabe mencionar que no se detectaron bacterias de este género en ACP. Esto sugiere que dicha bacteria puede provenir del aire y no de los tibicos. Sin embargo, cabe la posibilidad de que el tiempo de fermentación no haya sido suficiente para la formación de la nata.

Sería interesante realizar un estudio comparativo de la microbiota presente en el líquido de fermentación, en los tibicos y en la película o nata que se forma en el sustrato de piloncillo fermentado, para determinar el tipo y la homogeneidad de microorganismos involucrados en el proceso.

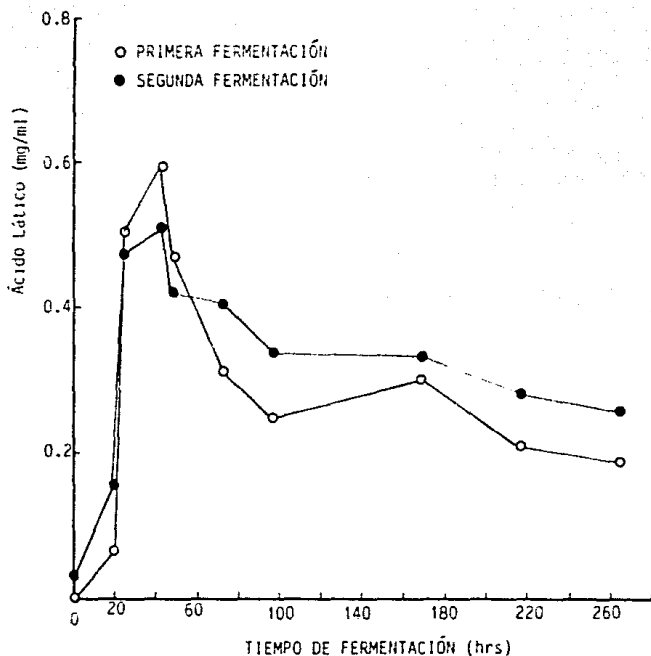


Figura 19. Cambios en la concentración de ácido láctico durante los dos procesos de fermentación en sustrato estéril de piloncillo, inculado con tибicos.

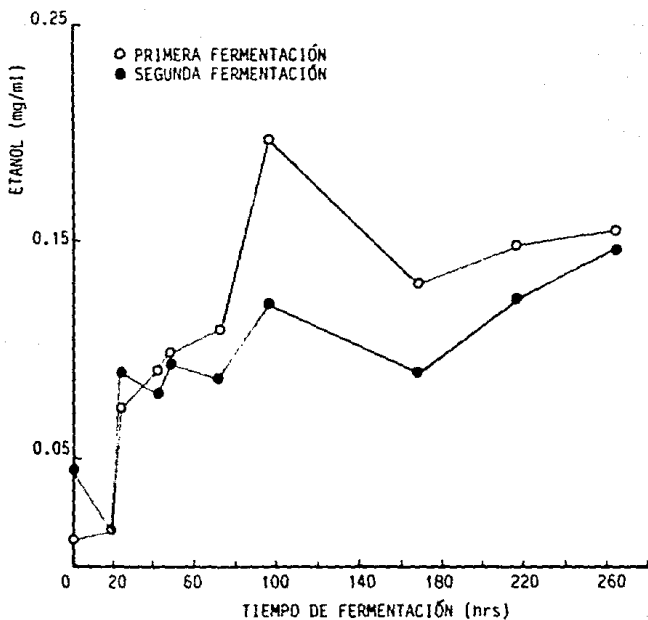


Figura 20. Cambios en la concentración de etanol durante los dos procesos de fermentación en sustrato estéril de piloncillo, inoculado con tибicos.

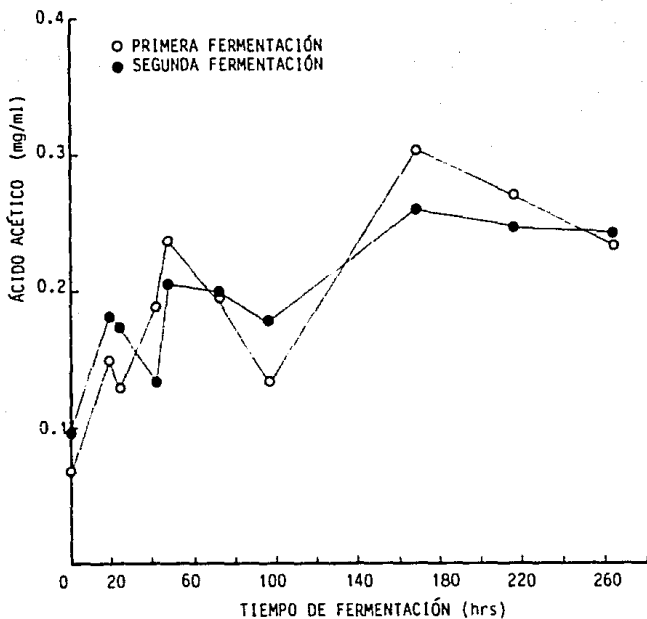


Figura 21. Cambios en la concentración de ácido acético durante los dos procesos de fermentación en sustrato estéril de piloncillo, inoculado con tībicos.



## 6.5. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS EFECTUADOS EN TIBICOS

### 6.5.1. HUMEDAD

La figura 22 representa los cambios ocurridos con respecto a la humedad de los tibicos. En dicha figura se observa un incremento en el contenido de humedad de las bioqleas durante el proceso de fermentación. El contenido de humedad inicial de los tibicos fue de 20%, debido a que éstos fueron previamente lavados e hidratados antes de empezar la fermentación. El contenido de humedad alcanzó su valor máximo a las 264 horas, siendo éste del 81.5% para ambos casos.

Los tibicos están formados por una matriz de dextranas, que son polímeros de glucosa capaces de retener agua durante la fermentación, lo que explica el incremento en el contenido de humedad de los tibicos durante los procesos. Cabe señalar que las pequeñas variaciones de humedad observables en la gráfica pueden deberse a errores de manipulación, ya que el método utilizado para la determinación de humedad es susceptible a tales errores en el momento de efectuar el pesaje de las muestras en el transcurso de la fermentación. Sin embargo, es importante señalar que se observó una diferencia inicial en el contenido de humedad en ambas fermentaciones la cual se mantuvo constante durante los procesos de fermentación.

## 6.5.2. PESO SECO DE LA BIOMASA DE TIBICOS

La figura 23 representa los resultados obtenidos en la cantidad de biomasa producida durante ambas fermentaciones. Se observó un incremento notable durante las primeras 96 horas, el cual fue de 2.47 a 2.76 g para la primera fermentación, y de 2.44 a 2.89 g para la segunda fermentación. De las 96 a las 264 horas se puede apreciar un incremento constante de biomasa total. Tales resultados pueden deberse a que durante las primeras 96 horas de fermentación se encuentran disponibles los nutrimentos necesarios para que los microorganismos realicen sus funciones metabólicas, por lo que se encuentran en condiciones óptimas para aumentar su población, y por consiguiente hay un aumento en la biomasa.

Por otra parte, la disminución en la velocidad del incremento de biomasa en las horas siguientes posiblemente se deba a que los nutrimentos presentes en el medio empiezan a escasear debido a los procesos de respiración y fermentación por parte de los microorganismos, que transforman la materia orgánica en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , etanol, ácido acético y otros compuestos volátiles que no son aprovechables para las células, así como a la acumulación de sustancias tóxicas que inhiben

el desarrollo de ciertos microorganismos, ocasionando un estancamiento en la producción de biomasa.

Cabe mencionar que no todo el peso obtenido era de las microbiogleas como tal, ya que a partir de las 72 horas de fermentación se empezó a formar una película muy delgada en la superficie del sustrato. Esta película ya había sido reportada anteriormente como una nata blanca y gruesa formada en la superficie del cultivo de tibicos en sustrato líquido de piloncillo (Armijo et al., 1991); sin embargo aún se desconocen los microorganismos que en este caso se encargan de sintetizarla.

#### 6.5.3. PROTEÍNA CRUDA

El contenido de proteína cruda registrada en los tibicos durante ambos procesos de fermentación se representa en la figura 24. Se puede apreciar que los tibicos contenían inicialmente 3.0 mg/g de proteína cruda, la cual aumentó paulatinamente conforme transcurrió el tiempo de fermentación. A las 264 horas se detectó el máximo contenido de proteína cruda en ambos procesos que fue de 5.3 mg/g en la primera fermentación, y 5.16 mg/g en la segunda. Los resultados obtenidos no advierten un incremento considerable o

significativo en cuanto al contenido de proteína de los tibicos. Esto puede indicar que el pequeño aumento de proteína fue debido a la producción de biomasa microbiana en las biogreas durante la fermentación.

Herrera et al. (1984) reportaron la presencia de una bacteria fijadora de nitrógeno, aislada de las biogreas, e identificada como *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop. Aunque en el presente trabajo no se hicieron los estudios microbianos de los tibicos, se considera necesario realizarlos para corroborar la presencia de *K. oxytoca* o de otros fijadores de nitrógeno (como los aislados en el presente estudio del líquido de fermentación), que pueden ser los responsables del incremento protéico en los tibicos.

Es importante mencionar que el aumento en la concentración de proteína por fijación de nitrógeno ya se había registrado en otros alimentos fermentados indígenas de México, como son: el pozol (Ulloa et al., 1971; Taboada et al., 1971; Ulloa y Herrera, 1972), el pulque (Herrera et al., 1972) y el tesgüino (Herrera, 1972; Lappe y Ulloa, 1989), por lo que dichos alimentos han sido considerados de gran importancia nutricional para los diferentes grupos que los consumen.

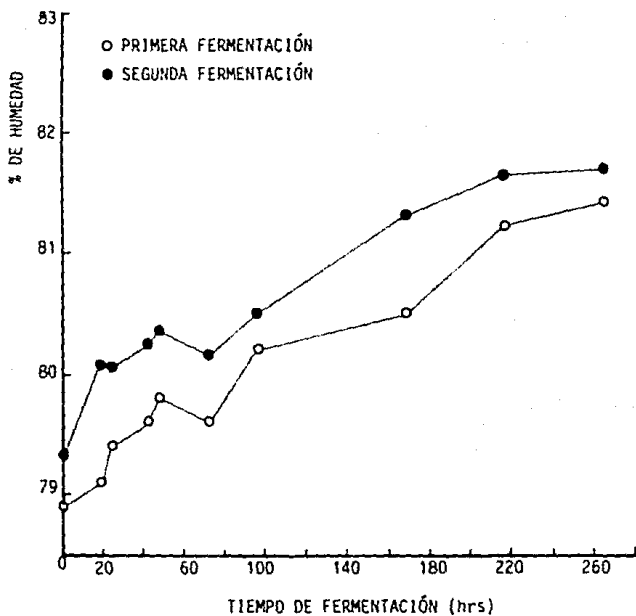


Figura 22. Cambios en la humedad de los tibicos durante diferentes tiempos de fermentación de soluciones estériles de piloncillo.

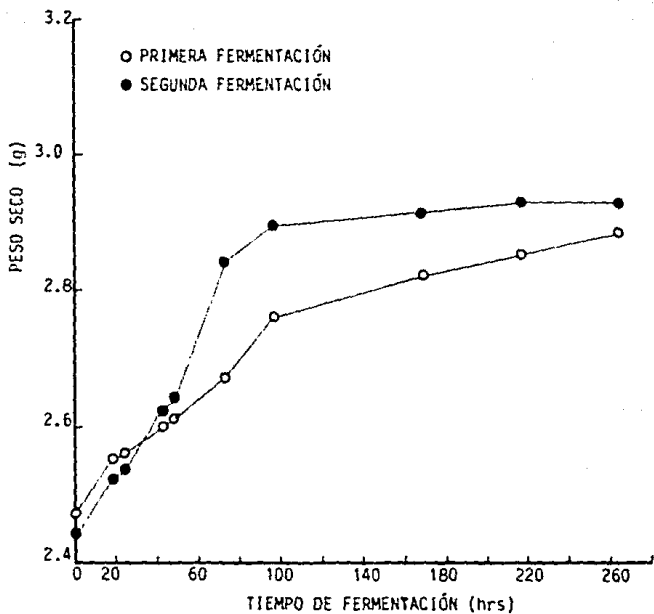


Figura 23. Cambios registrados en el peso de los túbicos durante ambos procesos de fermentación en soluciones estériles de piloncillo.

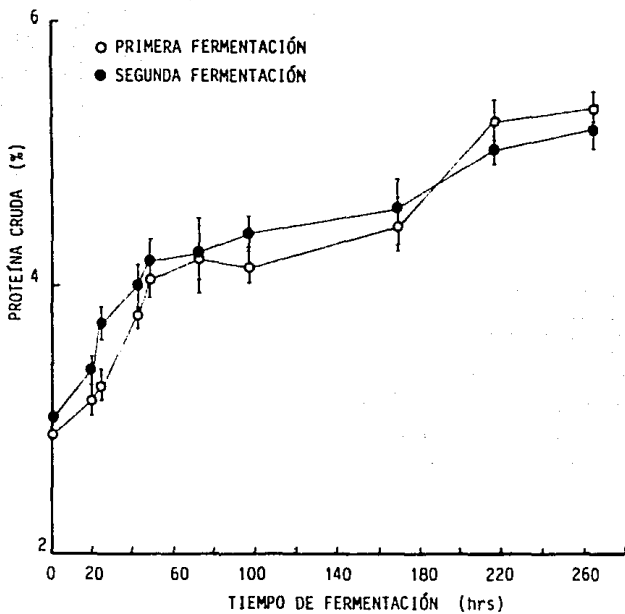


Figura 24. Cambios en el contenido de proteína cruda de los tibiaes durante los procesos de fermentación en soluciones estériles de piloncillo.

## 7. CONCLUSIONES

1. Durante el proceso de fermentación hubo una secuencia en las poblaciones de microorganismos:

- Inicialmente predominaron las bacterias lácticas.
- Posteriormente, al incrementarse las poblaciones de levaduras, disminuyeron las bacterias lácticas.
- Las poblaciones de Bacillus se mantuvieron relativamente constantes durante la fermentación.

2. Se presentaron tres tipos de fermentación durante el proceso:

- a). Láctica - alcohólica.
- b). Alcohólica - acética.
- c). Acética.

3. Por lo anterior, el líquido fermentado hasta las 48 horas se considera una bebida láctica, ligeramente alcohólica (conocida popularmente como "tepache de tibicos"), y a las dos semanas de fermentación se obtiene una bebida ligeramente alcohólica y acética.

4. Aunque el contenido final de proteína de los tibicos aumentó hasta 5 mg/g, no se considera que el incremento sea significativo.

5. El líquido de fermentación alcanzó valores de pH que oscilaron entre 3 y 2.8 a partir de las 42 horas, hasta el final de ambos procesos.



6. Comparando los resultados microbiológicos obtenidos en estudios anteriores, se puede decir que las levaduras *Cryptococcus albidus*, *C. guilliermondii*, *Brettanomyces claussenii* y *Rhodotorula rubra*, son especies reportadas por primera vez para el tepache de tibicos, así como las bacterias del género *Bacillus* (*B. brevis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. polymyxa* y *B. pumilus*) y *Enterobacter aerogenes*. Además, aunque no se identificaron hasta especie, fueron aisladas 4 bacterias homolácticas y 3 heterolácticas. Cabe mencionar que estos microorganismos han sido reportados en otros alimentos fermentados.

7. Existe una correlación de los cambios microbiológicos con los bioquímicos:

- Cuando ocurre un incremento de bacterias lácticas, se presenta un aumento de ácido láctico.

- Al aumentar las poblaciones de levaduras se incrementa el contenido de etanol.

- En el caso del incremento de ácido acético, se observó que cuando esto ocurre disminuye el etanol.

8. A pesar de tratarse de una fermentación no controlada que se realizó con un inóculo de poblaciones mixtas de microorganismos, las dos fermentaciones realizadas (que se efectuaron de la misma manera) fueron similares, tanto en crecimiento microbiano como en cambios bioquímicos.

## 8. SUGERENCIAS

A continuación se presentan algunas sugerencias que se hacen a partir de este trabajo:

1. En los ingenios azucareros de nuestro país se presenta la formación de masas gomosas y mucilaginosas capaces de taponar las tuberías y drenajes, por lo que resultaría interesante realizar un análisis comparativo (microbiológico y bioquímico) de estas masas originadas en los ingenios azucareros y los que se forman en los cladodios de *Opuntia* sp. y en los jugos de frutas en reposo, con la finalidad de determinar el origen de los granos de tибicos.

2. Determinar la función que desempeña cada microorganismo aislado de los granos de tибicos en la fermentación.

3. Identificar cuáles son los microorganismos responsables de la formación de la nata, con la finalidad de emplearlos posteriormente en investigaciones biotecnológicas, por ejemplo la obtención de celulosa cristalina químicamente pura.

4. Estudiar la calidad higiénica de la bebida y evaluar de qué manera la microbiota presente es capaz de

eliminar a los microorganismos patógenos del sustrato durante la fermentación.

5. Realizar una fermentación más prolongada y determinar hasta qué porcentaje de carbohidratos son consumidos y si las poblaciones microbianas son capaces de soportar esas condiciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, D., 1989. Estudio microbiológico, químico y nutricional de la fermentación del pozol. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Iberoamericana. México, D.F. 93pp.
- Armijo de V., C., 1990. Estudio de algunos parámetros en la producción casera de tibicos y su relación a la microbiota y productos de fermentación. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, 86 pp.
- Armijo de V., C.; Taboada, J.; Lappe P. y Ulloa, M. 1991. Productos de fermentación por tibicos y levaduras asociadas Rev. Lat-amer Microbiol. 33 (1).
- Barnett, J.A.; Payne, R.W. y Yarrow, D., 1979. A Guide to Identifying Yeast. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. 315 pp.
- Bibbins, M.M.D., 1990. Caracterización de enzimas extracelulares de microorganismos aislados de la caña de azúcar. Tesis. Facultad de Química, U.N.A.M. 85 pp.
- Calderón, A. y Herrera, T., 1989. Levaduras del pozol blanco y del pozol de mamey de la zona lacandona de Chiapas, México. Rev. Mex. Mic. 5:211-215.

- Casillas, L.E. y Vargas, L. A., 1984. La alimentación entre los mexicanos. En: Historia General de la Medicina en México. Tomo 1, México antiguo. Editor F. Martínez Cortez. Academia Nacional de Medicina y Facultad de Medicina, UNAM. México, pp 133-156.
- Claus, D. y Berkeley, R.C.W., 1986. *Bacillus Cochon*. En: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2, 9ª edición. Williams and Wilkins, Baltimore. pp.1105 - 1140.
- Díaz-Garcés, J.; Díaz-Garcés, V.; Ulloa, M. y Taboada, J., 1988. Determinación de algunos parámetros en la producción doméstica de tíficos. Rev. Lat-amer. Microbiol. 90: 143-146.
- Dubois, M.; Guilles, K.A. y Hamilton, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 26 (3): 350-356.
- Estrada-Cuéllar, L., 1985. Estudio de las levaduras de los tíficos y de la madre del vinagre. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 47 pp.
- Fell, J. W.; Statzell A. T. y Ahearn D. G., 1984. *Rhodotorula Harrison* En: Kreger van Rij (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study, 3ª ed., Elsevier, Amsterdam pp. 902-905.

- Godoy P., A., 1987. Recopilación bibliográfica sobre los aspectos: histórico, etnobiológico, microbiológico y químico de bebidas alcohólicas no destiladas, indígenas de México. Tesis profesional Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 96 pp.
- Harrigan, W. F. y Mc Cance, E. M., 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, Londres, pp. 73-74.
- Herrera, T.; Taboada, J. y Ulloa, M., 1972. Fijación de nitrógeno en el tesguino y el pulque. Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón México. Ser. Biol. Exp. 43 (1): 77-78.
- Herrera T. y Ulloa M. 1979. Estudio de *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras aisladas de la tuba de Colima. México. Bol. Soc Mex. Mic. 13: 187-194.
- Herrera, T.; Salinas, Ch. C. y Palacios, M. S., 1984. Estudio de cepas de *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautropp, fijadoras de nitrógeno, aisladas de las zoogreas llamadas tibicos. Rev. Lat-amer Microbiol. 27:253-257.
- Hesseltine, C.W., Wang, H.L., 1979. Fermented foods. Chem. and Industry. 12: 393-399.

- Hesseltine, C.W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation. Mycologia 57: 149-197.
- Hestrin, S. y Schramm, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. En: K.H. Steinkraus (ed.). Handbook of Indigenous Fermented Foods, Microbiology Series. 2. Marcel Dekker. Nueva York, pp. 412-420.
- Hibbert, H y Barsha, J., 1931. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIX. Structure of the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter xylinum* on glucose. En: Steinkraus, K.H. (ed.). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series. vol. 2, Marcel Dekker, Nueva York. pp. 141-420.
- Horisberger, M., 1969. Structure of the dextran of the tibi grains. Carbohydrate Res. 10: 379-385.
- Kingsbury, D. T., G.E. Wagner, G.E. y Segal, G.P. 1988. Microbiología médica. Limusa. México, D.F.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. Keys. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), The Yeast. A Taxonomic Study, 3ª ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 967-1005.
- Lappe, P. y Ulloa, M., 1989. Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesquino tarahumara. Instituto de Biología. UNAM. 123 pp.

- Lehninger, A. L., 1983. Bioquímica. 2ª ed., Omega, Barcelona. pp. 636, 777
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Lutz, M.L., 1898. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. Compt. Rend. Soc. Biol. Fr. 5: 1124-1126.
- Lutz, M.L. 1899. Nouvelle recherches sur le tibi. Bull. Trim. Soc. Mycol. Fr. 15: 167.
- Lutz, M.L., 1899. Researches biologiques sur la constitution du tibi. Bull. Trim. Soc. Mycol. Fr. 15:68.
- Mac Faddin, J.F., 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, Londres.
- Mascott y Terrés, M. 1952. Contribución al conocimiento de las levaduras de los tибicos del arroz. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 60 pp.
- Medina, M.P., 1985. Estudio de algunos aspectos bioquímicos de la fermentación que produce el pozol. Tesis profesional, Facultad de Química, Universidad La Salle, Méx. 76 pp.



Meyer, S.A.; Ahearn, D.G. y Yarrow, D. 1984. *Candida Berkhout*. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study, 3<sup>a</sup> ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 585-844.

Moinas, M., Horisberger, M. y Bauer H., 1980. The structural organization of the tibi grains revealed by light, scanning and transmission microscopy. Arch. Microbiol. 128:157-161.

Moreno y Díaz, M.P. 1932. Contribución al estudio bacteriológico y al análisis químico del vinagre que produce el tibico. Tesis profesional. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. UNAM. 56 pp.

Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of the Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83: 346.

Pidoux, M.; Brillouet, J.M. y Quemener, B., 1988. Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. Biotechnol Lett. 10 (6): 415-420.

Pidoux, M., 1989. The microbial flora of sugary kefir grains (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. MIRCEN Jour. 5. p. 223-238.

Pidoux, M.; Marshall, V. M.; Zanoni, P. y Brooker B., 1990. *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. Jour. off Appl. Bacteriol 69: 311-320.

- Richard, C. 1984. Genus VI. *Enterobacter* Hormenache and Edwards. En: Krieg N.R. y Holt J.G. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, 9ª ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 465-471.
- Rodríguez de Miranda, L. 1984. *Cryptococcus* Kützing emend. Phaff et Spencer. En: N.J.W. Kreger van Rij (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study. 3ª ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 845-856.
- Rose, A.H., 1982. Fermented Foods. Vol. 7, Economic Microbiology, Academic Press. Nueva York. 570 pp.
- Ruiz Oronoz, M., 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente como tibicos. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México 3:183-190.
- Saint-Phard-Delva, C.J., 1984. Aprovechamiento de los desperdicios de plátano maduro por fermentación sólida. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM. 83 pp.
- Seeley, H.W. y Vandermark, C.J., 1972. Microbes in Action, 2ª ed., Freeman and Company, San Francisco, pp. 51-57 y 101-106.
- Serrano, L.L., 1986. Los tibicos, su cultivo y su utilización potencial. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, 49 pp.
- Singleton, P. y Sainsbury, D. 1986. Dictionary of Microbiology. John Wiley and sons. 326 pp.

Ulloa, M. y Herrera, T. 1972. Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 14: 15-24.

Ulloa, M. y Herrera, T., 1976-1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas indígenas de México: pozol, tesquino, pulque, colonche y tepache. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México. Ser. Bot. 47-53: 145-163.

Ulloa, M. y Herrera, T., 1978. *Torulopsis taboadae*, una nueva especie de levadura aislada del colonche de Zacatecas, México. Bol. Soc. Mex. Mic. 12: 5-12.

Ulloa, M. y Herrera, T., 1981. Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen parte de las zoogreas llamadas tibicos en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 16: 63-65.

Ulloa, M.; Díaz-Garcés, J. ; Estrada-Cuéllar, L. y Taboada, J., 1987. Estudio de las levaduras de la madre del vinagre y pruebas de alimentación con aves y conejos utilizando esta nata en la dieta. Rev. Lat-amer. Microbiol. 29: 249-252.

Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P., 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista, México, Número 16. 77 pp.

- Sneath, P. H. A.; Mair, N.S.; Sharpe M.E. y Holt J.G.(eds.), 1987. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9<sup>a</sup> ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Stanier, R.Y.; Adelberg, E.A e Ingraham, J.L, 1986. Microbiología. REPLA, Barcelona.
- Steinkraus, K.H., 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Vol. 2, Microbiology Series. Marcel Dekker, New York. 340-373
- Summer, J. B. y Howell, S. F., 1934. A method for determination of saccharase activity. Jour. Biol. Chem. 108: 51-54.
- Taboada, J; Herrera, T. y Ulloa, M., 1971. Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. Rev. Lat-amer. Quím. 2: 188-191.
- Taboada, J.; Ulloa, M.; Estrada-Cuéllar, L. y Díaz-Garcés, 1986. Estudio de las levaduras de los tísticos y pruebas de alimentación con aves y roedores utilizando estas zoogreas en la dieta. Rev. Lat-amer. Microbiol. 29: 73-83.
- Ulloa, M.; Herrera T. y Taboada, J., 1971. *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* aisladas de diferentes muestras de tesgüino del estado de Jalisco, Méx. Bol. Soc. Mex. Mic. 11: 15-22.

- van der Walt, J.P., 1970. Criteria and methods used in classification. En: J. Lodder (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study, 2<sup>a</sup> ed. North Holland, Amsterdam, pp. 34-113.
- van der Walt., J. P., 1984. *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study, 3<sup>a</sup> ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 562-576.
- van der Walt, J.P. y Yarrow, D., 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), The Yeasts. A Taxonomic Study, 3<sup>a</sup>ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 45-104.
- Wacher, C.; Lappe; P.; Ulloa, M. y Taboada, J., 1991. Alimentos fermentados tradicionales. Notitec PUAL Vol.1 (3): 9-15.
- Yarrow, D., 1984. *Saccharomyces* Meyen ex Rees. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.). The Yeasts. A Taxonomic Study, 3<sup>a</sup> ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 379-395.