



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LA
ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA TIPO TEGÜINO
EN UN REACTOR DE BAJO VOLUMEN DE
TRABAJO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

DNÉFETM GARCÍA AYALA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARCO ANTONIO ORTIZ JIMENEZ
VOCAL: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
SECRETARIO: Profesor: VERONICA DOMINGUEZ VALDEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: GENARO JIMENEZ REYES
2° SUPLENTE: Profesor: KARLA MONTSERRAT GONZALEZ REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ

SUSTENTANTE:

DNÉFETM GARCÍA AYALA

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Nacional Autónoma De México

A su vasta y diversa comunidad que forma profesionales críticos.

A la Facultad de Química

A sus profesores y personal, que dan sus conocimientos de manera muy profesional.

Al Departamento de Biología de la Facultad de Química

Que permitió la realización de este proyecto y prestó instalaciones, material y equipo.

Al E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez

Por su enorme apoyo en la dirección de este proyecto.

A los miembros del H. Jurado

Por su tiempo y por sus aportaciones para el mejoramiento del trabajo escrito de este proyecto.

La manera como se presentan las cosas no es la manera como son; y si las cosas fueran como se presentan la ciencia entera sobraría”.

Carlos Marx

DEDICATORIA

A FLOR

Por entregarme tu amor y cariño, sincero y extraordinario.

A MARGARITA Y VENANCIO, MIS PADRES

Por dar lo mejor de sí, educación, cariño y alegría, sin medida y donde se necesita.

A YOLO, ORQUÍDEA Y VEMAR

Por ser lo que son, por dar una y otra vez apoyo y sonrisas.

A MIS AMIGOS

Por tener siempre una experiencia que compartir, porque su amistad es como una vela que sigue encendida con viento frío e incluso bajo la lluvia.

A MIS CAMARADAS

Por ser implacables y justos.

...Me has hecho ver la claridad del mundo y la posibilidad de la alegría...

Pablo Neruda

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	2
1.2 HIPÓTESIS	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 LAS FERMENTACIONES.....	4
2.2 EL TEGÜINO	6
2.3 BEBIDAS FERMENTADAS NO DESTILADAS DE MÉXICO.....	7
2.4 BEBIDAS FERMENTADAS DE MAÍZ.....	8
2.5 MICROORGANISMOS DE LA FERMENTACIÓN	9
2.6 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TEGÜINO	11
2.7 CARACTERÍSTICAS DEL TEGÜINO	13
2.8 LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	14
2.9 LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	15
2.10 CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS	18
2.11 DE UNA FERMENTACIÓN TRADICIONAL A UNA INDUSTRIAL.....	18
2.12 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	20
2.13 PROPIEDADES SENSORIALES DEL TEGÜINO	21
2.14 ORIGEN DEL SABOR CARACTERÍSTICO DE BEBIDA FERMENTADA	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 FERMENTADOR.....	23
3.2 CONTROL DEL pH	23
3.3 AGITACIÓN	23
3.4 AIREACIÓN	24
3.5 CONTROL DE TEMPERATURA	24
3.6 MEDIO DE CULTIVO	24
3.7 ESTERILIZACIÓN	25
3.8 CEPA DE LEVADURA	25
3.9 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA.....	25
3.10 SEMILLA DE FERMENTACIÓN E INOCULACIÓN	26
3.11 FERMENTACIÓN	26
3.12 TOMA DE MUESTRA	27
3.13 TRATADO DE MUESTRAS	27
3.14 CUENTA DE LEVADURAS.....	27
3.15 DENSIDAD	28
3.16 AZÚCARES REDUCTORES	28
3.17 AZÚCARES SOLUBLES.....	28
3.18 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL	29

3.19	EVALUACIÓN SENSORIAL.....	29
4.	RESULTADOS	32
4.1	IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA.....	32
4.2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	33
4.3	CINÉTICA DE pH	35
4.4	AZÚCARES	36
4.5	DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO.....	38
4.6	PRODUCCIÓN DE ETANOL	39
4.7	EVALUACIÓN SENSORIAL	40
5.	DISCUSIÓN	43
5.1	IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA.....	43
5.2	CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	43
5.3	CINÉTICA DE pH	45
5.4	AZÚCARES	46
5.5	DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO.....	48
5.6	PRODUCCIÓN DE ETANOL	49
5.7	EVALUACIÓN SENSORIAL	51
6.	CONCLUSIONES.....	53
7.	REFERENCIAS	55
8.	APÉNDICE.....	62
8.1	ANEXO A. ALINEACIÓN DE SECUENCIA GENÉTICA DE CEPA UTILIZADA.....	62

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Mujer Huichol preparando el tesgüino. Kal Muller (1982) Imagen prestada por el acervo Nacho López de la Fototeca Nacional.	5
Figura 2. Proceso tradicional de elaboración del tesgüino. Tomado y adaptado de Lappe Oliveras (1988).....	12
Figura 3. Fermentación alcohólica llevada a cabo por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Imagen tomada de https://adapaproject.org/	14
Figura 4. La levadura <i>S. cerevisiae</i> en la fermentación. Imagen tomada y adaptada de Albergaria et al. (2016).	16
Figura 5. Productos de la fermentación realizada por la levadura. Imagen tomada y adaptada de Moreno-Arribas y Polo (2009).	17
Figura 6. Fermentador (biorreactor) de 2 litros de trabajo. Imagen tomada y adaptada de labx.com.	19
Figura 7. Cuestionario de evaluación sensorial del tesgüino.	30
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fermentación tipo tesgüino. Obtenido con tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar. La velocidad específica de crecimiento obtenida en la fase exponencial del crecimiento es de 3.69 días^{-1} , mientras que el tiempo de duplicación de las levaduras durante ese periodo es de 4.5 horas.	34
Figura 9. Curva de cambio de pH en la fermentación. Obtenida a partir de tres experimentos independientes.	35

Figura 10. Curva de consumo de azúcares disueltos. Promedio y error estándar de los azúcares disueltos en el medio de cultivo medidos cada 24 horas, obtenido de tres experimentos independientes.....	36
Figura 11. Curva de consumo de azúcares en la fermentación. Obtenida de tres experimentos independientes.....	37
Figura 12. Curva de cambio en la densidad del medio de cultivo. Obtenida de tres experimentos independientes.....	38
Figura 13. Curva de aparición de etanol en la fermentación. Obtenida de tres experimentos independientes.....	39
Figura 14. Evaluación sensorial del tesgüino por panelistas no entrenados. 130 panelistas evaluaron el olor, apariencia, sabor y textura de la bebida fermentada obtenida bajo una escala hedónica.	40
Figura 15. Evaluación sensorial del tesgüino por panelistas no entrenados. 130 panelistas evaluaron el olor, apariencia, sabor y textura de la bebida fermentada obtenida bajo una escala hedónica. Se registran las frecuencias apiladas.	42
Tabla 1. Características bromatológicas del tesgüino tradicional. Tomados de Lappe Oliveras (1988).....	13
Tabla 2. Evaluación sensorial de la bebida fermentada tipo tesgüino.	41

1. INTRODUCCIÓN

El tesgüino es una bebida tradicional elaborada mediante la fermentación de maíz germinado, que es consumida principalmente en la región noroccidental de México.

Se han hecho estudios que analizan la importancia histórica y social del tesgüino dentro de las tradiciones indígenas, así como estudios que analizan su composición química y microbiológica; por un lado, se ha señalado que el tesgüino tiene una gran importancia social para las poblaciones indígenas que lo consumen (Kennedy 1963); por otro lado, se ha observado que el tesgüino tiene propiedades nutricionales superiores a las materias primas con las que se elabora (Lappe Oliveras 1988).

Sin embargo, hasta ahora no ha habido ningún desarrollo experimental para la producción de la bebida fuera del ámbito tradicional, no ha habido investigaciones que tomen los elementos fundamentales de la elaboración tradicional del tesgüino y los empleen para el desarrollo de una bebida fermentada de maíz de interés en la investigación biotecnológica básica, en la enseñanza y en el desarrollo de bebidas fermentadas a nivel industrial.

Por lo que el presente trabajo tiene la intención de establecer las condiciones básicas necesarias para la elaboración de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino en un reactor de bajo volumen de trabajo, en condiciones de un laboratorio de enseñanza de la Facultad de Química, para conocer cuál es la problemática para llevar a cabo su elaboración y para conocer si la bebida elaborada bajo estas condiciones es del agrado de los consumidores.

Para esto se plantea el establecimiento de una metodología sencilla y asequible controlando las variables fisicoquímicas que usualmente no se regulan en la fermentación tradicional del tesgüino. Asimismo, se plantea que el protocolo para la elaboración de la bebida fermentada de maíz tipo tesgüino, en conjunto con un análisis sensorial, puede servir para optimizar y escalar la producción de la bebida.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones técnicas y microbiológicas para la elaboración de una bebida fermentada de maíz tipo "tesgüino" en un fermentador de bajo volumen de trabajo que sirva de base para prácticas dentro de un laboratorio de enseñanza.

1.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de fermentación propuestas.
- Evaluar comportamiento de determinadas variables fisicoquímicas durante la fermentación.
- Elaborar curvas de consumo de sustrato y formación de producto durante la fermentación.
- Realizar análisis sensorial para la bebida fermentada de maíz.

1.2 HIPÓTESIS

El desarrollo de un protocolo para la elaboración de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino que establezca condiciones óptimas de fermentación

reportadas en la literatura como temperatura, una velocidad de agitación, aireación y otras, en condiciones de un laboratorio de enseñanza, permitirá el establecimiento de un protocolo de fermentación que puede ser usado en un laboratorio de enseñanza y permitirá la obtención de una bebida fermentada de maíz con aceptación por parte de panelistas no entrenados en una evaluación sensorial.

2. ANTECEDENTES

2.1 *LAS FERMENTACIONES*

Las fermentaciones fueron conocidas por todas las civilizaciones de la antigüedad. Se emplean para conservar los alimentos, mejorar la digestibilidad y enriquecer los sustratos con vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos esenciales. También convierten las proteínas vegetales a texturas y sabores de carne salada y producen los diversos sabores y aromas que han enriquecido la dieta humana en el pasado, en el presente y lo continuarán haciendo en el futuro (Hui et al. 2004).

Muy temprano en la historia de la humanidad, en el nacimiento de la agricultura los granos eran colectados en vasijas. Es altamente probable que tales granos, en ocasiones se humedecieran con las lluvias, germinaran y fermentaran dando paso a las primeras fermentaciones alcohólicas: las primeras cervezas primitivas (Hui et al. 2004; Chambers y Pretorius 2010).

La metodología más primitiva conocida utiliza la masticación de los granos para mezclar saliva como la fuente de amilasa para hidrolizar el almidón de las semillas en azúcares más simples. Posteriormente se deja fermentar el sustrato con levaduras del ambiente. La producción de chicha en la región de los andes aún utiliza esta técnica y la del sake japonés lo hacía en sus primeros tiempos (Staller 2009; Hui et al. 2004).



Figura 1. Mujer Huichol preparando el tesgüino. Kal Muller (1982) Imagen prestada por el acervo Nacho López de la Fototeca Nacional.

Los vinos y cervezas primitivos, como el tesgüino mexicano o el kafir africano, son bastante diferentes de los vinos y cervezas modernos. Los antiguos son generalmente turbios, debido a que contienen partículas del sustrato de fermentación, células de levaduras junto con alcohol y vitaminas del complejo B, de tal manera que son muy nutritivos y ricos en energía (Hui et al. 2004).

2.2 EL TESGÜINO

El tesgüino, del náhuatl *tecuin* o *tecuini* (latir el corazón; andar echando llama), es una bebida alcohólica semejante a la cerveza, elaborada mediante la fermentación de maíz germinado o de jugo de caña de maíz (Universidad Nacional Autónoma de México 2012; El Colegio de México, A. C. 2017).

El tesgüino es consumido desde tiempos inmemoriales por grupos étnicos de varias regiones de México, como los yaquis y pimas de Sonora; los tarahumaras (rarámuris) de Chihuahua; los guajiríos de Chihuahua y Sonora; los tepehuanos de Durango; los huicholes de Jalisco y Nayarit; y los zapotecas de Oaxaca (Ulloa, Herrera y Lappe 1987; Staller 2009).

El consumo del tesgüino es de primordial importancia en la organización social y cultural de los tarahumaras y ha ejercido gran influencia en su historia (Kennedy 1963). Junto con la danza, constituyen una señal de identidad para el pueblo rarámuri (Acuña Delgado 2005).

Para algunos de estos grupos étnicos el tesgüino es acostumbrado en eventos familiares, políticos, religiosos y deportivos. Se utiliza como ofrenda en ceremonias religiosas, como en la procesión del culto al sol de los huicholes y en los ritos de semana santa de algunos indios de Sonora y Sinaloa. Los tarahumaras lo beben durante los juegos de pelota para adquirir fortaleza, y en las tesgüinadas. Éstas son reuniones que se llevan a cabo durante todo el año y en las que se toman

decisiones de índole política y económica, o se remunera el trabajo comunitario. Esta bebida, diluida con agua, se da de beber a niños a pocos días de nacidos, y en ocasiones constituye un complemento importante en su dieta (Garibay, Ramírez y Canales 1993).

2.3 BEBIDAS FERMENTADAS NO DESTILADAS DE MÉXICO

En México se han elaborado bebidas alcohólicas fermentadas desde tiempos inmemoriales. Se han elaborado bebidas de frutos, de cortezas, de pulpa, de raíces y de sabia.

Entre las bebidas de frutos se encuentra el colonche, el cual se obtiene por fermentación del jugo de tunas (*Opuntia* spp.); el saguaro o sahuaro, que se obtiene fermentando los frutos de diversas cactáceas como el cardón (*Pachycereus pringlei*), la pitahaya dulce (*Stenocereus thurberi*), el saguaro o sahuaro (*Carnegeia gigantea*), la pitahaya agria (*Machaerocereus grummosus*) y la tuna barbona (*Lophocereus schottii*); la sidra, la cual se obtiene por fermentación del zumo de la manzana (*Malus communis*) o de la pera bergamota (*Citrus bergamia*); el tejuino de tuna (*Opuntia* spp.), el cual se obtiene por fermentación del zumo de tuna en infusión con cáscaras de timbre (*Acacia angustissima*); el tepache se obtiene por fermentación de piña (*Ananas* spp.), manzana (*Malus communis*), naranja (*Citrus aurantium*) y otras frutas. Para la elaboración de tepache de algunos frutos se utiliza los tibicos como inóculo, los cuales son masas globosas transparentes constituidos por bacterias y levaduras en asociación sinérgica responsable de la fermentación de los sustratos (Godoy, Herrera y Ulloa 2003).

Entre las bebidas de cortezas se encuentra el balché, que se prepara mediante fermentación de la corteza del árbol homónimo (*Lonchicarpus longistylus*), miel de abeja y agua; el vino de corteza de zarzaparrilla, que se elabora añadiendo corteza de zarzaparrilla (*Hibiscus* spp., *Heliocarpus* spp. o *Smilax* spp.) a la cerveza de maíz o al vino de caña de azúcar.

Entre las bebidas de pulpa se puede mencionar al vino de maguey, el cual se prepara con los corazones del maguey (*Agave spp.*), los cuales son cocidos, machacados, colados, mezclados con maíz, hervidos y fermentados en recipientes herméticos (Godoy, Herrera y Ulloa 2003; Escalante et al. 2016).

De las bebidas de raíces destaca las bebidas cuya base es la mandioca o yuca (*Manihot esculenta*), en la cual se cuece la raíz, se mastica, se cuela y se fermenta. De las bebidas de savia se conoce el caldo picado, el cual se elabora fermentando la caña de azúcar; y el pulque, que es una bebida fermentada de la savia (aguamiel) del maguey (*Agave spp.*) que se elabora colocando el aguamiel en un recipiente al que se agrega semilla (pulque), dejándose fermentar entre una y cuatro semanas, amplificando la cantidad de bebida al inocular el pulque recién elaborado en el aguamiel recién colectado (Godoy, Herrera y Ulloa 2003; Escalante et al. 2016).

2.4 BEBIDAS FERMENTADAS DE MAÍZ

Las cervezas de maíz tienen una gran variedad de formas de preparación, en algunas se combina la malta de maíz o los granos de maíz con malta o granos de otras especies como sorgo o mijo. Las cervezas de maíz se caracterizan por ser ácidas, producto de la fermentación de bacterias y levaduras; y se caracterizan por ser opacas, debido a la gran cantidad de partículas sólidas y levaduras suspendidas en la solución. El contenido de alcohol de las cervezas de maíz varía entre 1 y 8% (Hui et al. 2004).

En las regiones indígenas donde se consume algún tipo de cerveza de maíz ésta se considera un importante suplemento nutricional, ya que provee calorías, proteínas y vitaminas del complejo B, que frecuentemente son deficientes en las dietas basadas en granos (Jyoti Prakash Tamang 2010). Son consumidas cuando la fermentación está activa, por lo que se descomponen en un periodo corto de

tiempo, entre 1 y 5 días. A diferencia de las cervezas claras que se consumen frías, las cervezas de maíz se suelen tomar a temperatura ambiente (Steinkraus 2004).

En diversas partes del mundo se elaboran bebidas de maíz y otros cereales, en África se produce *Togwa* en el oriente de África, *Ahai* en Ghana, *Busaa* en Kenia, *Kaffir (Bantu)* en Sudáfrica, *Munkoyo* en Zambia, *Pito* en Nigeria, *Talla* en Etiopía, *Mangisi* en Zimbabwe entre otros; en América se produce *Acupe* en Venezuela, *champus* en Colombia, *Asua* en Ecuador, *Cachiri* en Brasil, *Chicha* en Sudamérica, *Tesgüino* y *Sendecho* México, entre otros; en Europa se produce *Bosa* en Yugoslavia, *Buza* en la Región balcánica, entre otros; en Asia se produce *Badek* y *Pachwai* en diversas partes de Asia, *Bimburam* en Filipinas, *Chiang*, *Lohopani*, *Torani* y *Makai ko jaanr* en la India, *Ruou nep chan* en Vietnam, entre otros (Lappe y Ulloa 1989).

2.5 MICROORGANISMOS DE LA FERMENTACIÓN

En las fermentaciones tradicionales se ha observado una relación mutualista entre bacterias y levaduras, donde las primeras crean las condiciones apropiadas para el crecimiento de las levaduras al hidrolizar el almidón y bajar el pH, y las levaduras por su parte proveen estimulantes del crecimiento como vitaminas y aminoácidos necesarios para el crecimiento bacteriano (Querol y Fleet 2006).

Algunos de los microorganismos que se desarrollan durante la fermentación del tesgüino son adquiridos de las materias primas con las que se elabora la bebida. Se adquieren del maíz, de los fortificantes o liga, de los utensilios, del agua y del aire; aunque la principal fuente de inóculo de la fermentación de tesgüino es el material residual adherido a las paredes de las ollas tesgüineras que permanece entre una y otra fermentación (Lappe y Ulloa 1989).

Se han aislado varias especies de levaduras durante la elaboración del tesgüino. De las materias primas utilizadas se aislaron mohos con capacidad

amilolítica como *Aspergillus niger*, *Eurotium rubrum* y *Fusarium moniliforme*. De la olla tesgüinera se ha aislado *Brettanomyces intermedius*, *Hansenula anomala* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros.

Al inicio de la fermentación Lappe Oliveras (1988) observó la presencia de *Brettanomyces intermedius* (productora de ácido acético) y de *Cryptococcus albidus* (levadura oxidativa y patógeno oportunista), sin observar la presencia de estos microorganismos en las etapas subsecuentes. También observó las levaduras fermentadoras *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* (formadoras de película y de una gran cantidad de ésteres), *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces kluyveri*, que se presentaron desde el principio hasta las etapas más avanzada de la fermentación, mostrando un crecimiento lento a lo largo de la misma (Lappe Oliveras 1988) .

Otros de los microorganismos de la fermentación son algunas bacterias homo y heterolácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, que proporcionan al tesgüino un sabor ácido y refrescante mediante sus metabolitos (Lappe y Ulloa 1989); así como *Bacillus megaterium* (Godoy, Herrera y Ulloa 2003). La microbiota del tesgüino varía de acuerdo al modo de preparación, al sustrato y a los aditivos utilizados, ya que no hay una metodología estandarizada para su preparación.

A las 50 horas, en la etapa final de la fermentación, Lappe Oliveras (1988) observó que la concentración de *Saccharomyces cerevisiae* rebasó en más de 40 veces la concentración de la segunda levadura más abundante, mostrando predominancia y coincidiendo con las observaciones de Herrera y Ulloa (1976).

2.6 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TESGÜINO

El proceso de elaboración del tesgüino varía entre los grupos étnicos, aunque de manera general se realiza de la siguiente manera: los granos de maíz se remojan en agua por varias horas, se escurren y se ponen en bolsas o recipientes que son metidos en un hoyo que se cava en el suelo o mantenidos en condiciones de oscuridad, para que germinen de manera rápida y se generen brotes amarillentos que confieran un sabor dulce a la bebida; se muele los granos germinados, se hierve con agua la pasta obtenida hasta tener un atole amarillento; se deja enfriar el atole y se trasvasa a las ollas tesgüíneras, las cuales presentan residuos de fermentaciones pasadas adheridos a sus paredes; se añaden diversas plantas (que se consideran como catalizadores o fortificantes) a la olla tesgüínera y la mezcla se deja fermentar por un tiempo variable (de uno hasta diez o más días), al cabo del cual la bebida está lista para consumirse (Godoy, Herrera y Ulloa 2003; Lappe y Ulloa 1989).

Los fortificantes o catalizadores vegetales que más se usan en la elaboración del tesgüino son: cortezas de *Randia echinocarpa*, *R. laevigata* y *R. watsonii*; las hojas de *Datura metaloidea* y de *Stevia serrata*; el jugo de *Ariocarpus fissuratus* y de *Lophophora williamsii*; las raíces de *Phaseolus metcalfei*, se utilizan además otras hierbas (Ulloa, Salinas y Herrera 1974; Herrera y Ulloa 1976; Ulloa, Herrera y Lappe 1987; Lappe y Ulloa 1989; Godoy, Herrera y Ulloa 2003).

Los fortificantes podrían ser una fuente de fenilaminas que inhiben el desarrollo de algunos microorganismos, o de factores de crecimiento necesarios para el establecimiento de los diferentes microorganismos responsables de la fermentación (Godoy, Herrera y Ulloa 2003).

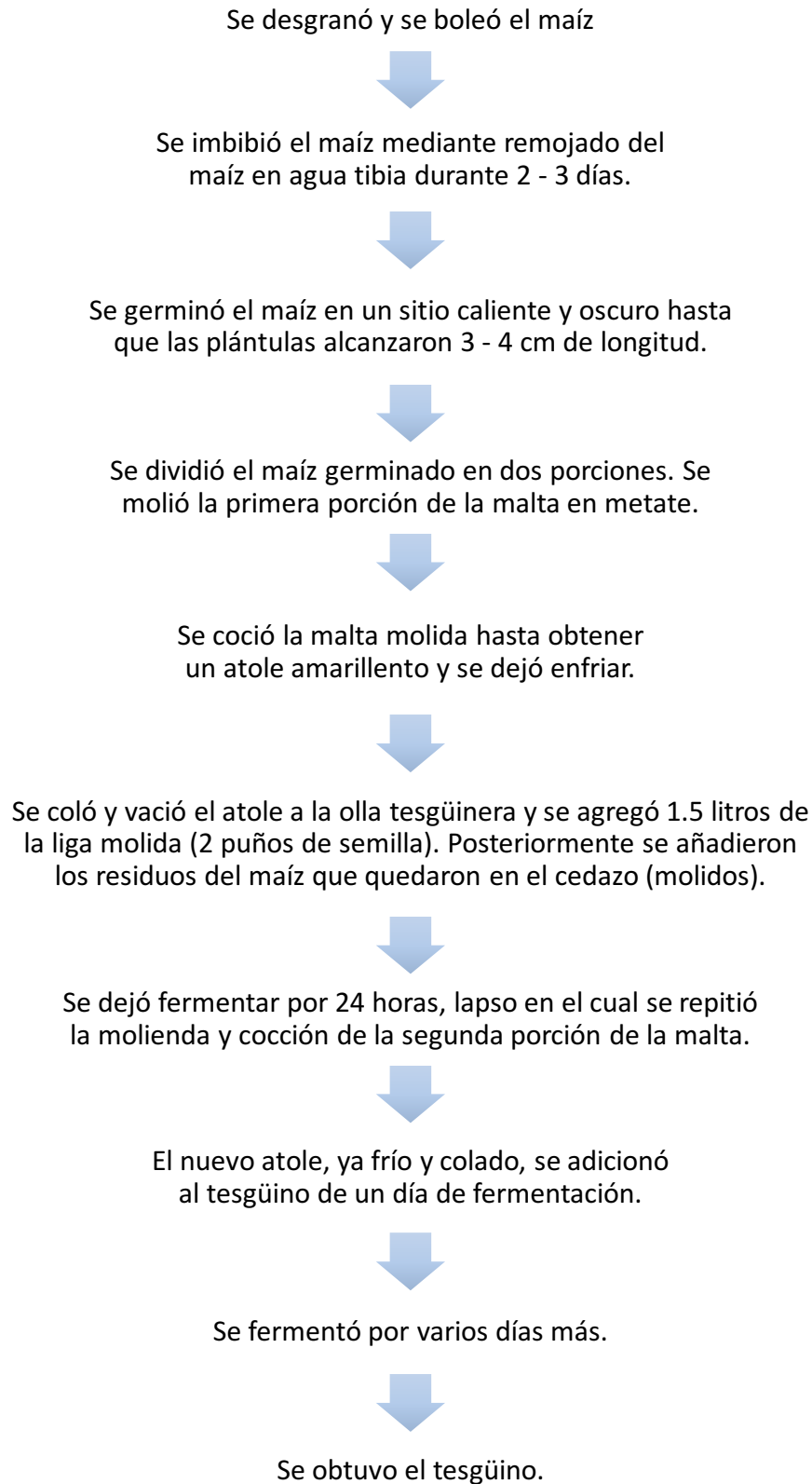


Figura 2. Proceso tradicional de elaboración del tesgüino. Tomado y adaptado de Lappe Oliveras (1988).

2.7 CARACTERÍSTICAS DEL TEGÜINO

El tsegüino es una cerveza opaca, de consistencia espesa, con un pH con valor cercano a 3. A las 50 horas de fermentación el tsegüino tradicional contiene $10^{11.96}$ UFC/mL de levaduras, $10^{11.85}$ UFC/mL de bacterias, 9.6% de sólidos totales, 1.27% de proteínas, 0.15% de cenizas, 0.41% de grasas, 0.30% de niacina, 0.33% de ácido láctico, 0.11% de ácido acético, 0.014% de metanol, 3.73% de etanol, entre otras sustancias no reportadas (Lappe Oliveras 1988).

De los análisis bromatológicos, Lappe Oliveras (1988) determinó que las propiedades nutritivas del tsegüino (a 50 h de fermentación) son superiores a la fermentación inicial y a las materias primas, ya que observó un incremento de proteína (58.02%, desde fermentación de 24 h), grasas (82.2%, desde fermentación de 24 h) y ácido láctico (alcanzó 0.329%), constituyéndose como un complemento importante en la dieta de los grupos étnicos que consumen el tsegüino.

Tabla 1. Características bromatológicas del tsegüino tradicional. Tomados de Lappe Oliveras (1988).

	Maíz	Tsegüino (50 horas de fermentación)
Contenido de proteínas (base seca)	9.43%	13.20%
Contenido de grasa (base seca)	6.14%	4.28%
Contenido de ácido láctico (base húmeda)	0.018%	0.329%
Contenido de ácido acético (base húmeda)	0.054%	0.110%

Se ha encontrado que las bebidas fermentadas como el tsegüino pueden contener compuestos que mejoran la salud de quien lo consume. Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en los vegetales. Se ha relacionado la presencia de estos compuestos en la dieta humana como factor preventivo de

enfermedades cardiovasculares, neurológicas y cancerígenas, ya que son efectivos donadores de hidrógeno y por tanto antioxidantes (Stevenson y Hurst 2007).

Nava Arenas (2010) observó que a lo largo del proceso de elaboración del tesgüino de maíz azul la cantidad de determinados antioxidantes se modificó. Los compuestos fenólicos aumentaron 101% aunque la cantidad de antocianinas disminuyó el 43 %. El secuestro de radicales libres por parte del tesgüino de maíz azul se redujo en 20% con respecto al maíz sin procesar; por lo que la bebida conserva propiedades antioxidantes, agregando más valor nutritivo al tesgüino (Nava Arenas 2010).

2.8 LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es el proceso anaerobio mediante el cual se hidroliza el azúcar para formar anhídrido carbónico y etanol.

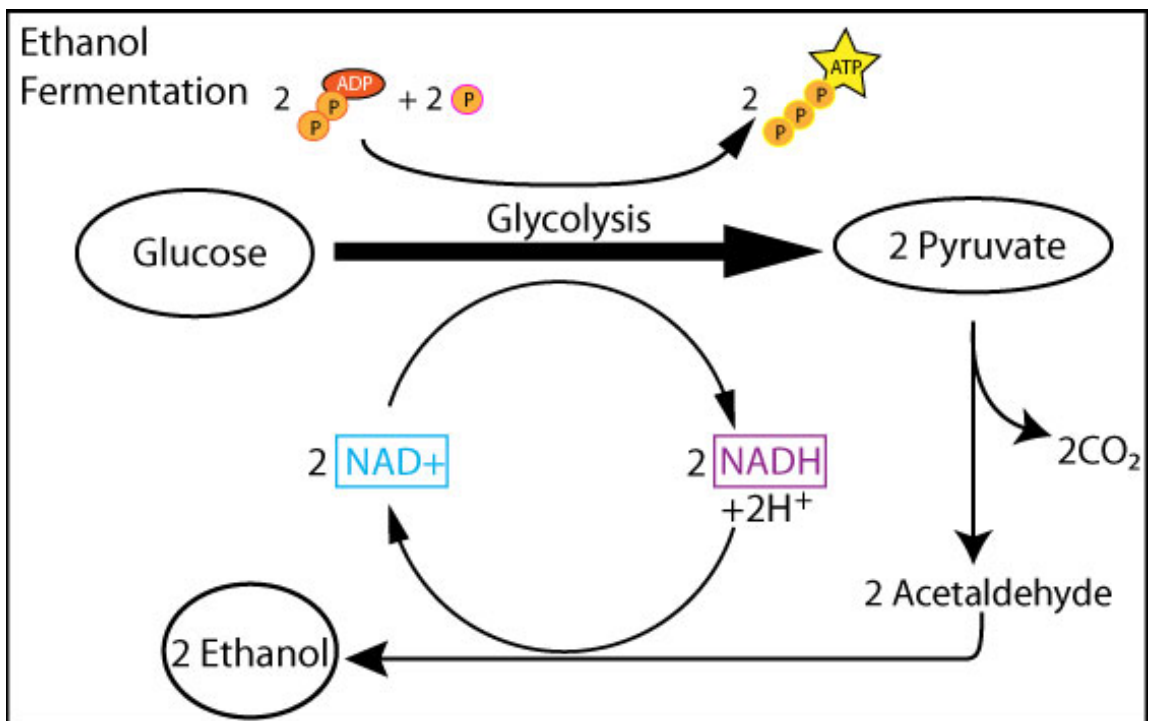


Figura 3. Fermentación alcohólica llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*. Imagen tomada de <https://adapaproject.org/>.

La fermentación alcohólica tiene la función de dar la capacidad al microorganismo (*Saccharomyces cerevisiae*) de realizar la oxidación de la glucosa en ausencia de oxígeno; ya que al prescindir de un aceptor final de electrones el microorganismo puede crecer en ambientes con baja o nula concentración de oxígeno, como en el fondo de un líquido de una fermentación (Dashko et al. 2014).

De tal manera que la levadura realiza la glicólisis generando moléculas de piruvato que no pueden ser metabolizadas en el ciclo de Krebs por la ausencia de oxígeno y, en su lugar, son metabolizadas por las enzimas piruvato descarboxilasa para producir aldehído; y este compuesto es metabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa para producir etanol (Eram y Ma 2013).

2.9 LAS LEVADURAS EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Durante las fermentaciones alcohólicas *Saccharomyces cerevisiae* muestra dominancia sobre otros microorganismos competidores. Parte de este dominio se ha atribuido a su alto poder fermentativo y a su aptitud de aguantar las duras condiciones del medio de cultivo, con bajo pH, con un alto contenido de etanol que puede llegar hasta una concentración de 12-16% v/v, alta concentración de ácidos orgánicos, baja disponibilidad de oxígeno y la reducción de nitrógeno y otros nutrientes del medio de cultivo (Albergaria y Arneborg 2016; Ciani y Maccarelli 1998). Esto les permite dominar el final de las fermentaciones alcohólicas por sobre otros microorganismos.

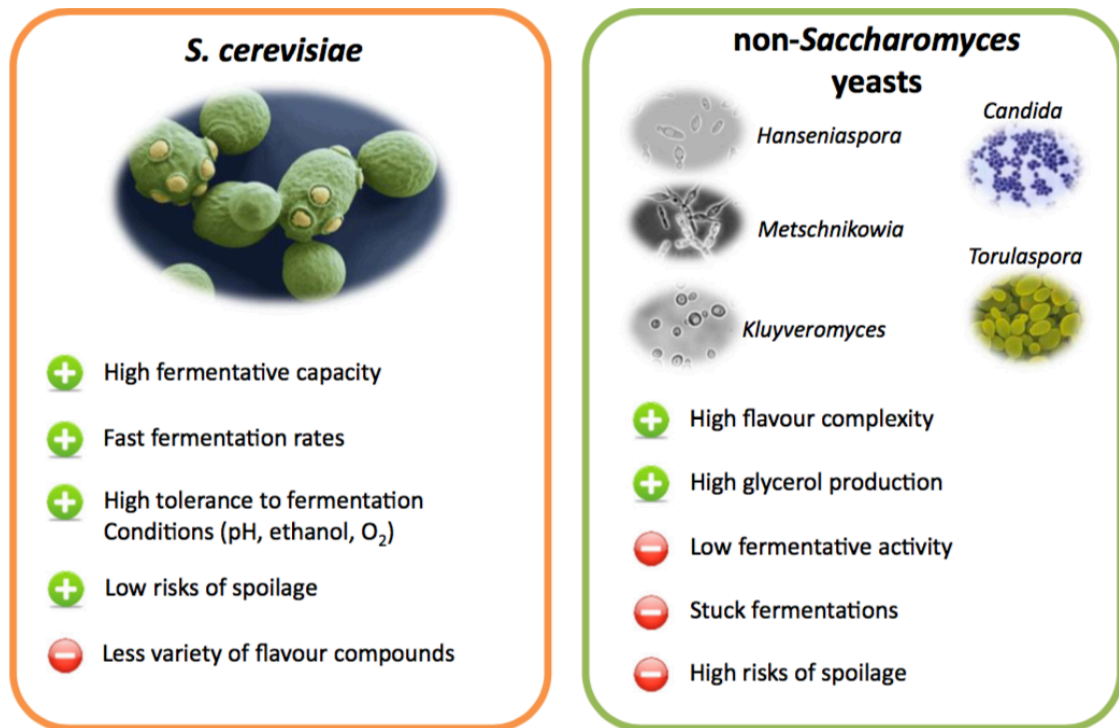


Figura 4. La levadura *S. cerevisiae* en la fermentación. Imagen tomada y adaptada de Albergaria et al. (2016).

A esto, se le unen las estrategias defensivas que generan las levaduras para combatir a otros posibles microorganismos contaminantes; como la eliminación por contacto célula-célula (Nissen y Arneborg 2003; Renault, Albertin y Bely 2013; Kemsawasd et al. 2015), arresto debido a la alta densidad celular de *S. cerevisiae* (Nissen, Nielsen y Arneborg 2003), la producción de compuestos tóxicos y/o péptidos antimicrobianos cuando hay alta densidad celular de *S. cerevisiae* (Pérez-Nevado et al. 2006; Albergaria et al. 2010; 2013 ; Kemsawasd et al. 2015; Comitini et al. 2005; Nehme, Mathieu y Taillandier 2010; Osborne y Edwards 2007), los mecanismos de eliminación que no incluyen el contacto célula-célula (Wang, Chunxiao, Mas y Esteve-Zarzoso 2015), el manejo de factores no ambientales como oxígeno, nitrógeno y etanol para eliminar a la competencia (Taillandier et al. 2014).

Adicionalmente se ha determinado que *Saccharomyces cerevisiae* tiene una alta producción específica de etanol y una baja producción de biomasa, lo cual la

vuelve un microorganismo de alto valor para las fermentaciones (Albergaria y Arneborg 2016).

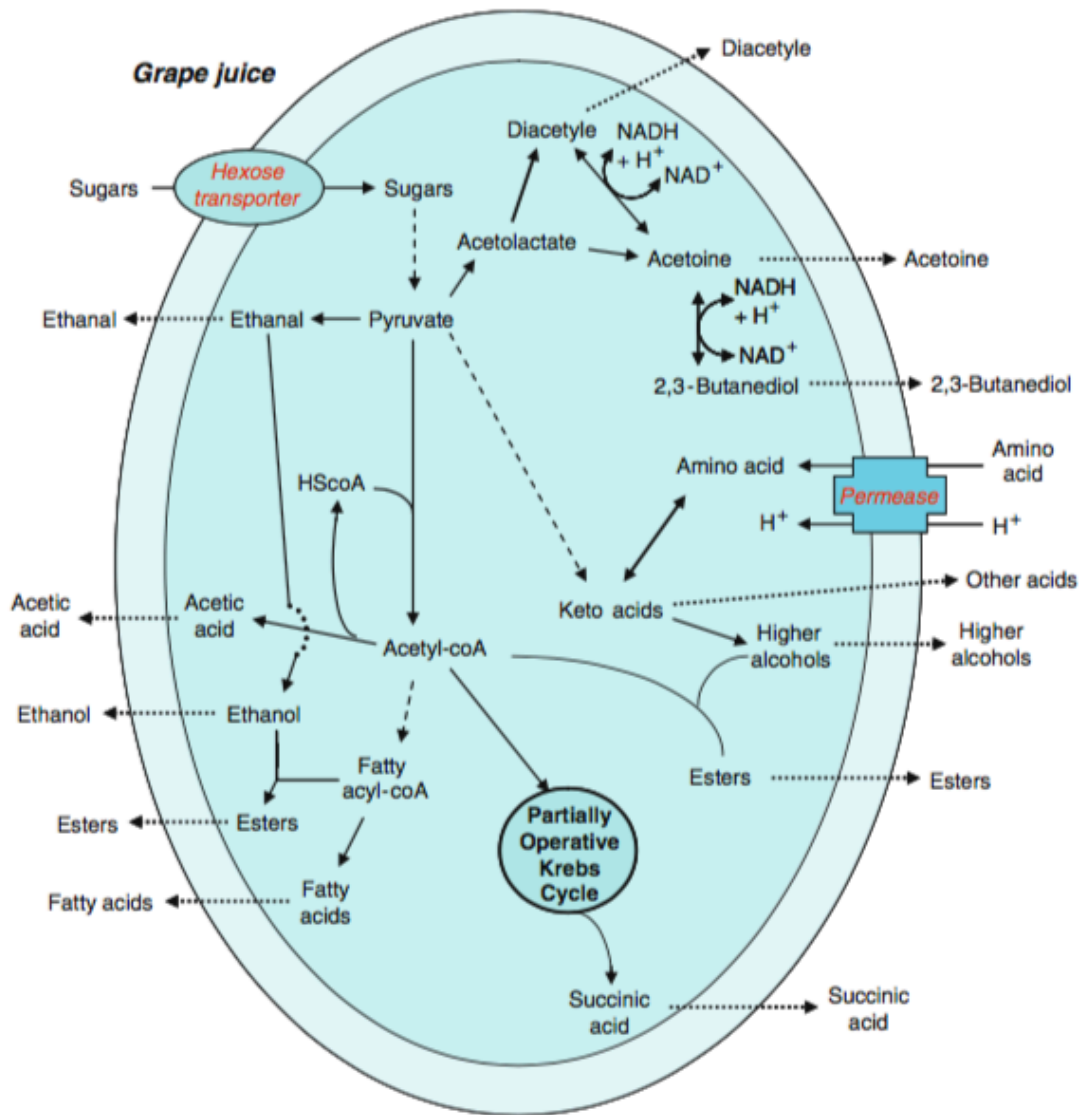


Figura 5. Productos de la fermentación realizada por la levadura. Imagen tomada y adaptada de Moreno-Arribas y Polo (2009).

Se han descrito otros productos de la fermentación como al diacetyl, acetoina, etanal, ácido acético, alcoholes superiores, ésteres, ácido succínico. Entre todos estos subproductos se genera una mezcla de compuestos que aporta de manera positiva o negativa olor y sabor característicos a la bebida fermentada (Moreno-Arribas y Polo 2009).

2.10 CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS

El peso específico de la cerveza está determinado por la concentración de los diversos componentes de la bebida. La concentración de etanol es un elemento muy importante en el peso específico del tesgüino. A medida que avanza la fermentación se va generando etanol en el medio y la menor densidad de este compuesto ($\rho = 0.789 \text{ g/cm}^3$) produce que disminuya la densidad del medio de cultivo (Chen et al. 2013).

Durante la primera fase de una fermentación espontánea, las bacterias ácido lácticas producen ácidos orgánicos como el ácido láctico y ácido acético, entre otros, que bajan el pH generando un ambiente tóxico para muchos microorganismos contaminantes (Albergaria y Arneborg 2016). En la fase posterior de la fermentación espontánea las levaduras dominan la fermentación, bajando el pH aún más, llegando a valores de $\text{pH}=3$, y produciendo etanol que puede llegar a valores de 12-18%, y compuestos que dan un sabor característico a la bebida fermentada (Hui et al. 2004; Gobbi et al. 2013). La investigación ha mostrado que una temperatura alta (30 °C) reduce el tiempo de fermentación para alcanzar el nivel más alto de etanol (Wang, S et al. 1999).

2.11 DE UNA FERMENTACIÓN TRADICIONAL A UNA INDUSTRIAL

Es importante destacar que el consumo del tesgüino se circunscribe a determinados grupos indígenas y a sectores mestizos en las regiones donde habitan los primeros y que su producción y consumo está altamente relacionado a la cultura y a la organización social de estos grupos de consumidores, de allí que su consumo se de en eventos que dan identidad a la gente que lo consume como las festividades religiosas (Kennedy 1963).

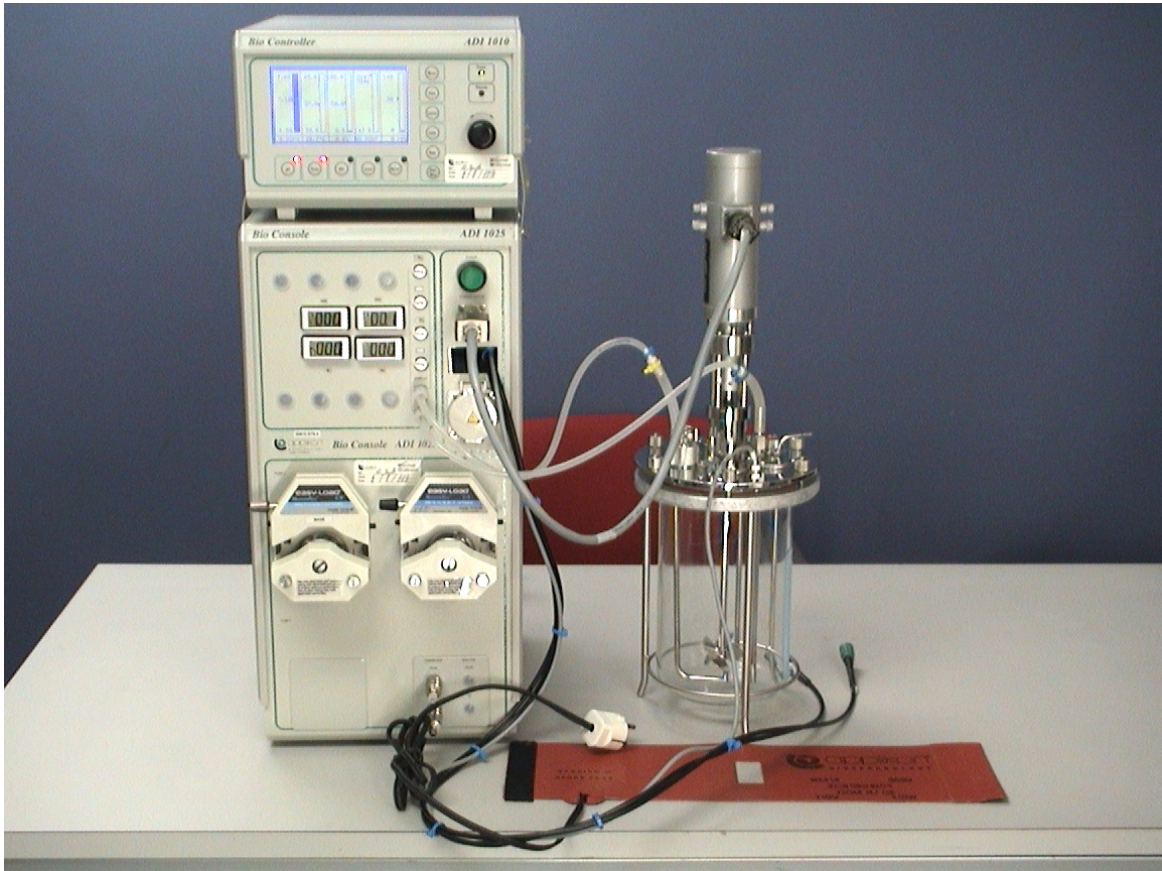


Figura 6. Fermentador (biorreactor) de 2 litros de trabajo. Imagen tomada y adaptada de labx.com.

La producción artesanal del tesgüino forma parte de la identidad cultural de la gente que lo consume. El hecho de que no haya intentos de escalar la producción del tesgüino a una de tipo industrial, no ha obligado a que se genere una regulación por parte del estado, como sí ha sucedido con el pulque, el cual es otra bebida fermentada no destilada consumida en mayor proporción en la región central de México, y al cual se le aplican diversas normas: Para el pulque manejado a granel (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1972e), para la determinación de azúcar previa (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1972a), para la determinación del pH (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1972b), para la determinación de acidez (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1972c) y para la determinación de índice de refracción de la bebida (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial 1972d). A esta reglamentación se agrega el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015, Bebidas Alcohólicas -

Denominación, Especificaciones Fisicoquímicas, Información Comercial y Métodos de Prueba (Secretaría de Economía 2016).

2.12 *EVALUACIÓN SENSORIAL*

La evaluación sensorial se utiliza para provocar, medir, analizar e interpretar reacciones a aquellas características de los alimentos, las bebidas y los materiales, sobre cómo son percibidos por la vista, el tacto, el gusto, el olfato y el oído de los consumidores (Poste et al. 1991; Mason y Nottingham 2002; Stone, Bleibaum y Thomas 2012a).

Entre las pruebas sensoriales existentes, las pruebas afectivas son utilizadas para medir actitudes subjetivas hacia un producto con base en sus propiedades sensoriales. La prueba más comúnmente usada para medir el grado de gusto hacia una muestra es la escala hedónica, ya que permite evaluar fácilmente algunos parámetros sensoriales para crear una escala de gusto o satisfacción de los consumidores hacia el producto de interés (Poste et al. 1991; Stone, Bleibaum y Thomas 2012b).

En esta prueba se les pide a los panelistas que evalúen una o más muestras y que indiquen el grado de gusto del producto o de características del producto en una escala de 1 al 9, dando a 1 el valor de "disgusta extremadamente" y a 9 el de "gusta extremadamente". Generalmente se utiliza a panelistas no entrenados (Poste et al. 1991; Stone, Bleibaum y Thomas 2012b).

El uso de esta prueba es importante ya que actualmente no existen bebidas fermentadas semejantes al tescüino elaboradas de manera industrial o semiindustrial que tengan amplia distribución en el mercado mexicano de la que se tengan métodos de evaluación sensorial descritos.

2.13 PROPIEDADES SENSORIALES DEL TEGÜINO

Entre las cervezas de maíz producidas alrededor del mundo se ha descrito en muchas de ellas que son de sabor ácido (refrescante), dulce, ligeramente alcohólico, ligeramente amargo; de coloración ligeramente café; de apariencia opacas; (Jyoti Prakash Tamang 2010; Osorio-Cadavid et al. 2008).

El tesgüino fue descrito por Nava Arenas (2010) como una bebida de aspecto turbio, con sabor ácido y refrescante, ligeramente alcohólico, aroma ligeramente alcohólico, textura líquida y ligeramente viscosa; mientras que el tejuino, que es una bebida semejante al tesgüino, fue descrito por la misma autora como una bebida color café claro, espesa en algunas ocasiones y ligera en otras, dulce por la adición de piloncillo, ligeramente ácido y sin contenido alcohólico.

2.14 ORIGEN DEL SABOR CARACTERÍSTICO DE BEBIDA FERMENTADA

Durante la fermentación *Saccharomyces cerevisiae* produce una gran variedad de sustancias con propiedades aromáticas, que además son vitales para el complejo sabor de las bebidas fermentadas. Las sustancias producidas por *Saccharomyces cerevisiae* que determinan el sabor de las bebidas fermentadas se pueden dividir en seis grupos principales: ácidos orgánicos, alcoholes superiores, compuestos carbonílicos, moléculas azufradas, compuestos fenólicos y ésteres volátiles (Saerens et al. 2010).

Los ésteres volátiles representan una fracción muy pequeña entre las otras sustancias producidas por los *S. cerevisiae*, sin embargo, comprenden el conjunto más importante de moléculas que aportan el aroma y sabor de las bebidas fermentadas. Son producidas principalmente por la enzima alcohol acetil transferasa Atf1 de *S. cerevisiae*, con la finalidad de atraer insectos como las moscas para que éstos dispersen las levaduras en la naturaleza (Christiaens et al.

2014). Estas moléculas son responsables del característico y muy apreciado aroma frutal, dulce y perfumado de las bebidas fermentadas (Saerens et al. 2008).

Hay dos categorías de ésteres de importancia en el sabor de las bebidas fermentadas. El primer grupo son los ésteres de acetato. El acetato de isoamilo, con su distintivo sabor a plátano, es el éster de acetato con mayor influencia presente en la mayoría de las cervezas, vinos (blancos) y sake. El segundo grupo comprende a los ésteres de ácidos grasos de cadena media y de etilo. De este grupo destaca el octanoato de etilo, que causa un sabor a manzana y anís (Saerens et al. 2010).

El etanol es un importante constituyente volátil de las cervezas; es producido por el metabolismo de las hexosas por *Saccharomyces cerevisiae* y otros microorganismos fermentadores. La presencia de etanol influye en la percepción de otros compuestos; la percepción e intensidad de ésteres de fruta es más alta en vinos dealcoholizados (<1% etanol) que en los alcoholizados (10-11% etanol); la astringencia y el sabor amargo también están influenciados por la concentración de etanol (Ebeler 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *FERMENTADOR*

Se utilizó un fermentador de investigación con volumen de trabajo de 2 litros (Applikon) con tapa en la parte superior con puertos para agregar medio de cultivo, para toma de muestra, para agregar ácidos y bases, para termopozo, para adaptar potenciómetro, con entrada y salida de aire, con cilindro para recirculación de agua fría y con sistema de agitación mecánica.

3.2 *CONTROL DEL pH*

Para la determinación instantánea de pH, se adaptó al fermentador un potenciómetro (Applikon, modelo PG 13.5) acoplado a un controlador (Cole Parmer, modelo 01970), que a su vez regula el intervalo de pH del medio de cultivo mediante la activación de bombas peristálticas de adición de ácido y de base (Cole Parmer, modelo 7016-20). Para cada fermentación se ajustó (calibración) el potenciómetro antes del proceso de esterilización del medio de cultivo.

3.3 *AGITACIÓN*

Se empleó un sistema de agitación mecánica con controlador (Applikon, modelo ADI 1012), motor (Applikon, modelo ADI Z5 100002M0) y flecha de agitación con dos propelas de tipo turbina de hoja plana (Applikon). Se aplicó una velocidad de agitación de 400 rpm desde el inicio hasta el día 2 de la fermentación. Durante este periodo de la fermentación la agitación ayudó a desintegrar los componentes sólidos de mayor tamaño del medio de cultivo. A partir de entonces se fijó la velocidad en 200 rpm.

3.4 AIREACIÓN

Se utilizó un sistema de aireación conformado por motor de aire (marca y modelo ND), controlador de tipo rotámetro (ND, modelo 3216-28) y dos filtros de aire (Aervent-50) de PTFE de 5 cm diámetro y poros de 0.2 μm acoplados a la manguera de entrada de gases. En el puerto para la salida de gases se acopló un condensador para mantener constante el volumen del medio de cultivo. Al final de esta línea de salida se acopló un filtro de algodón para garantizar la esterilidad del biorreactor. Durante la fermentación se eliminó la aireación para garantizar la fermentación anaerobia.

3.5 CONTROL DE TEMPERATURA

Se utilizó un sistema de control de temperatura conformado por un sensor de temperatura (platino RTD) colocado en termopozo, una manta de calentamiento (Applikon, modelo M3414) y un recirculador de agua fría con válvula solenoide (Burkert, modelo: 126093H) acoplados a un controlador (B & C electronics, modelo 2C0TR7615). Desde el inicio y hasta el final de la fermentación se ajustó la temperatura a 30 ± 1 °C.

3.6 MEDIO DE CULTIVO

Para la preparación del medio de cultivo, en primer lugar se generó una mezcla equivalente de maíz amarillo y de maíz pozolero (*Zea mays*) cultivados en la zona central de México (Bruman 2000); luego se realizó la imbibición de las semillas mediante el remojo de la mezcla de maíces durante 24 h; enseguida se sometió a las semillas a las condiciones de germinación siguientes: se escurrieron los granos, se mantuvieron en condiciones de oscuridad por 6 días a una temperatura aproximada de 25 °C, tiempo durante el cual se generaron brotes amarillentos que alcanzaron una longitud de 4 - 5 cm; luego se mezcló 200 gramos

del maíz germinado (100 g/L), 600 gramos de piloncillo derretido (300 g/L) y se aforó con agua potable hasta un volumen de 2 litros; finalmente se colocó el medio de cultivo preparado en la jarra de reacción.

3.7 ESTERILIZACIÓN

Se cerró la tapa del fermentador, se sellaron los puertos y se protegieron los filtros de aire. Una vez preparado el fermentador, se esterilizó en una autoclave de laboratorio durante 30 min a 121 °C y 103 kPa. Una vez concluido el proceso de esterilización se colocó en aireación a 1 vvm durante el periodo de enfriamiento a temperatura ambiente para garantizar que la presión al interior del fermentador fuera superior a la presión atmosférica y así evitar que una presión negativa posibilitara la contaminación microbiana.

3.8 CEPA DE LEVADURA

Se utilizó una cepa de *Saccharomyces spp.* presente en la colección de cepas del M. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez, la cual fue aislada de una tina de fermentación en una zona mezcalera en el estado de Oaxaca, México. Se hizo aislamiento de colonia en caja petri con medio de papa dextrosa agar (PDA) y cultivo en matraz en medio YEPD de la cepa de levadura.

3.9 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA

El DNA de la levadura fue extraído de acuerdo a Larena et al. (1999) y diluido a una concentración de 40 ng/uL. La región que codifica para el RNAr fue amplificada a través de un multi-block termociclador (Applied Biosystems, Gene Amp, PCR System 2400). Los “primers” utilizados para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2, fueron el ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') y el ITS4A (5'-

CGCCGTTACTGGGGCAATC CCTG-3'). Los parámetros para la amplificación se establecieron de la siguiente forma; una temperatura inicial de desnaturalización de 94 °C por 4 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 1 min. Una temperatura de alineación de 51 °C por 1min y una temperatura de extensión de 69 °C por 10 min. Al final de la reacción de amplificación, una muestra de 10 uL fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, para su verificación (Sambrook et al 1989). El producto de PCR de la electroforesis fue purificado a través del sistema o kit de extracción rápida (Marligen Bioscience, Inc Germany) Los productos fueron secuenciados en el laboratorio del Dr. J. Laclette del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, finalmente los productos se analizaron en el Gene Bank National center of Biotechnology Information (NCBI).

3.10 SEMILLA DE FERMENTACIÓN E INOCULACIÓN

La preparación de la semilla de fermentación se realizó sembrando una asada de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en 100 mL de medio extracto de levadura (YEPD) por 48 h a 29 °C con una agitación de 100 rpm; Al final de este periodo se realizó el conteo de células viables. Se configuró al fermentador con las condiciones de temperatura y agitación descritas; luego se realizó la inoculación de 1×10^6 levaduras por mililitro de medio de cultivo (Pereira et al. 2013; Ferreira et al. 2010), depositando la semilla en el fermentador a través del puerto apropiado, en condiciones asépticas.

3.11 FERMENTACIÓN

Se realizó un conjunto de tres experimentos independientes con los mismos valores de las variables mencionadas: agitación, aireación, control de temperatura, medio de cultivo, esterilización de fermentador con medio de cultivo, preparación de semilla de fermentación, inoculación, toma de muestras, tratado de muestras, conteo de levaduras; la fermentación se realizó por 18 días manteniendo la

temperatura a 30 ± 1 °C, una agitación de 400 rpm durante las primeras 48 horas, y de 200 rpm durante el resto de la fermentación. Al final de la fermentación se trasvasó el líquido resultante a un recipiente y se conservó sellado a temperatura ambiente.

3.12 TOMA DE MUESTRA

Se realizó una toma de muestra inmediatamente después de la inoculación y cada 24 horas a través del puerto de toma de muestra, para lo cual se recreó transitoriamente la agitación inicial de 400 rpm, tomando 20 mL de muestra en condiciones asépticas, trasvasándose a tubos preparados y etiquetados.

3.13 TRATADO DE MUESTRAS

Tan pronto como se realizó la toma de cada muestra, se contabilizó las levaduras para determinar el crecimiento microbiano, y enseguida se congeló la muestra. Una vez reunidas todas las muestras congeladas de la fermentación, éstas se descongelaron, se separó el paquete celular y los residuos sólidos de la fermentación mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos. Se refrigeró el sobrenadante de cada muestra hasta que se utilizó para los análisis que adelante se detallan.

3.14 CUENTA DE LEVADURAS

Se determinó la curva de crecimiento de las levaduras mediante conteo de células en cámara de Neubauer. Para esto se resuspendió la muestra mediante agitación, se diluyó hasta 1/40 con agua y se mezcló con lugol de gram. Finalmente se contabilizó el número de levaduras en un microscopio óptico con el objetivo de 40X.

3.15 DENSIDAD

La determinación de la densidad de cada muestra se llevó a cabo mediante picnometría con el siguiente procedimiento: Se descongeló cada muestra y se llevó a 25 °C; se registró el peso seco del picnómetro; se llenó el picnómetro con la muestra de fermentación y se registró la masa a 25 °C; se obtuvo la densidad de cada muestra relacionando el volumen del picnómetro y el peso de la muestra.

3.16 AZÚCARES REDUCTORES

Se realizó hidrólisis de oligosacáridos de la siguiente manera: Se tomó una alícuota de 200 µL de cada muestra de fermentación y se colocó en un tubo de ensayo; se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico con pH=1.4; se selló cada tubo de ensayo y se calentó a 90 °C por 20 min; se enfrió y se neutralizó con NaOH (10%); se ajustó el volumen a 5 mL.

Se continuó el análisis de azúcares reductores de la siguiente manera: Se tomó una alícuota de 250 µL de cada muestra hidrolizada y se colocó en un tubo de ensayo; se adicionó 250 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS); se selló cada tubo y se calentó en un baño maría a temperatura de ebullición (93.5 °C) durante 10 minutos; se enfrió y se adicionaron 5 mL de agua; se midió la absorbancia a 540 nm. El anterior procedimiento se hizo para concentraciones conocidas de dextrosa y para las muestras tratadas, con las primeras se elaboró una curva patrón.

3.17 AZÚCARES SOLUBLES

Se realizó la determinación de azúcares solubles mediante refractometría: se llevó la muestra a 20 °C, luego se colocó una alícuota de la muestra (dos gotas)

en el lente del refractómetro, se tapó con la cubierta transparente, se orientó el refractómetro hacia la luz natural, se observó a través del ocular, y se leyó los grados Brix indicados en la escala de medición.

3.18 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL

Para la determinación de etanol se realizó una titulación por retroceso mediante el siguiente procedimiento: Se generó una disolución ácido/dicromato depositando 10 mL de dicromato de potasio 0.05 M en un tubo falcon de 50 mL, donde luego se adicionó lentamente 10 mL de ácido sulfúrico (50%); se introdujo un tubo de ensayo de 5 x 80 mm en el interior del tubo falcon evitando que el contenido del tubo falcon se derramara al interior del tubo de ensayo; Se depositó 100 μ L de muestra en el tubo de ensayo; se tapó el tubo falcon y se incubó por 24 horas a 37 °C para favorecer la evaporación del etanol presente en la muestra y su oxidación por el dicromato presente en el tubo falcon.

Se continuó con el análisis de la siguiente manera: Se retiró el tubo de ensayo del tubo falcon; se trasvasó la disolución ácido/dicromato de potasio a un matraz erlenmeyer de 125 mL; se selló el matraz y se calentó a 50 °C por 10 minutos; se enfrió y se adicionó 10 mL de yoduro de potasio 0.5 M para la reducción del dicromato excedente; se tituló el I_2 resultante con tiosulfato de sodio 0.1 M, utilizando indicador de almidón.

3.19 EVALUACIÓN SENSORIAL

Se llevó a cabo un análisis sensorial de la bebida obtenida, para ello se realizó lo siguiente: Se mezclaron las bebidas obtenidas de todas las fermentaciones realizadas en un recipiente; se almacenó la mezcla sellada hasta que se observó un gran sedimento en el fondo del recipiente; se decantó la bebida y se eliminó el sedimento; se filtró la bebida en algodón y se guardó en botellas de vidrio.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

PRUEBA DE EVALUACIÓN SENSORIAL
PRODUCTO: Bebida tipo tesgüino

Nombre _____

Edad _____

Tiene frente a usted una muestra de bebida tipo “tesgüino”. Evalúe cada propiedad en el orden en el que aparece en la tabla, de izquierda a derecha.

Para cada propiedad seleccione una frase apropiada.

PROPIEDADES SENSORIALES			
Olor	Apariencia	Sabor	Textura
			Gusta extremadamente
			Gusta mucho
			Gusta moderadamente
			Gusta ligeramente
			Ni gusta ni disgusta
			Disgusta ligeramente
			Disgusta moderadamente
			Disgusta mucho
			Disgusta extremadamente

Comentarios _____

Figura 7. Cuestionario de evaluación sensorial del tesgüino.

Se entrevistó a 130 panelistas no entrenados, entre hombres y mujeres con un promedio de 25.2 años de edad en dos locaciones de la Ciudad de México, en la Facultad de Química de la UNAM, y en el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Los panelistas evaluaron en una escala hedónica las propiedades sensoriales de la bebida elaborada. Todos ellos probaron 10 mL de la bebida y respondieron el cuestionario de la figura 7. Para el análisis se asignó un número del 1 al 9 a las respuestas de los panelistas, siendo 1 el valor para *Disgusta extremadamente* y 9 el valor para *Gusta extremadamente*.

4. RESULTADOS

Durante el actual protocolo se realizaron diversas pruebas para evaluar la cinética de crecimiento de las levaduras, el cambio en la concentración de azúcares reductores como producto de la degradación por parte de los microorganismos, el cambio en la densidad del medio de cultivo como consecuencia del aumento de la concentración de etanol en el mismo, y se realizó un estudio para conocer la aceptación de las propiedades sensoriales de la bebida entre una muestra de personas.

4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA

Se realizó la identificación de la cepa de levadura utilizada en la fermentación mediante la amplificación y secuenciación de la sección que codifica para el RNAr (5.8s). La secuencia genética obtenida fue la siguiente:

```
GTCAGCATCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTAAAGAAATTTAATAATTTTGAA
AATGGATTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACA
AGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGTCTTGCTAGGCT
TGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATA
GGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAA
CTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAACACAAACAA
TTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTA ACTGGAAATTTT
AAAATATTA AAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGT
CATTTCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAACTT
GAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCG
TGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTGTACCAACTGCGGCTAA
```


TCTTCTTTATTCTGAACGGATTGGAACGATATCCATGAAAAGAAAACATCCACGC
 GGACAAAGATCTTAAAGAATGATCTCCAATCATGTAGGTAGGAACCGCCGCACT
 TACGCATGTCCATTAGCGGGAAGAAAGAGAAAGCAACCTAGGATTGCTTCAGCC
 AACCAGGGGGCGG

Enseguida se realizó un alineamiento genético en la base de datos del Banco Genético del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), de las aproximadamente 900 pb. El resultado del alineamiento es que la secuencia tiene una identidad del 95% de una secuencia del cromosoma XII de *Saccharomyces cerevisiae* YJM456, tal como se observa en el Anexo A (Zhang et al. 2000; Morgulis et al. 2008).

4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Se analizó el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio de cultivo preparado con los ingredientes mencionados para conocer la cinética crecimiento de la levadura utilizada en este medio de cultivo, así como para verificar que no hubiera contaminación alguna.

En la Figura 8 se observan las mediciones de concentración celular hechas cada 24 horas. La fermentación inició con la inoculación del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* contenido en la semilla de fermentación. La inoculación produjo una concentración celular inicial del orden de 1×10^6 células viables de *Saccharomyces cerevisiae* por mililitro de medio de cultivo.

El uso de la semilla de fermentación permitió observar la fase exponencial de crecimiento desde el tiempo cero de la fermentación sin observarse la fase de adaptación (fase lag).

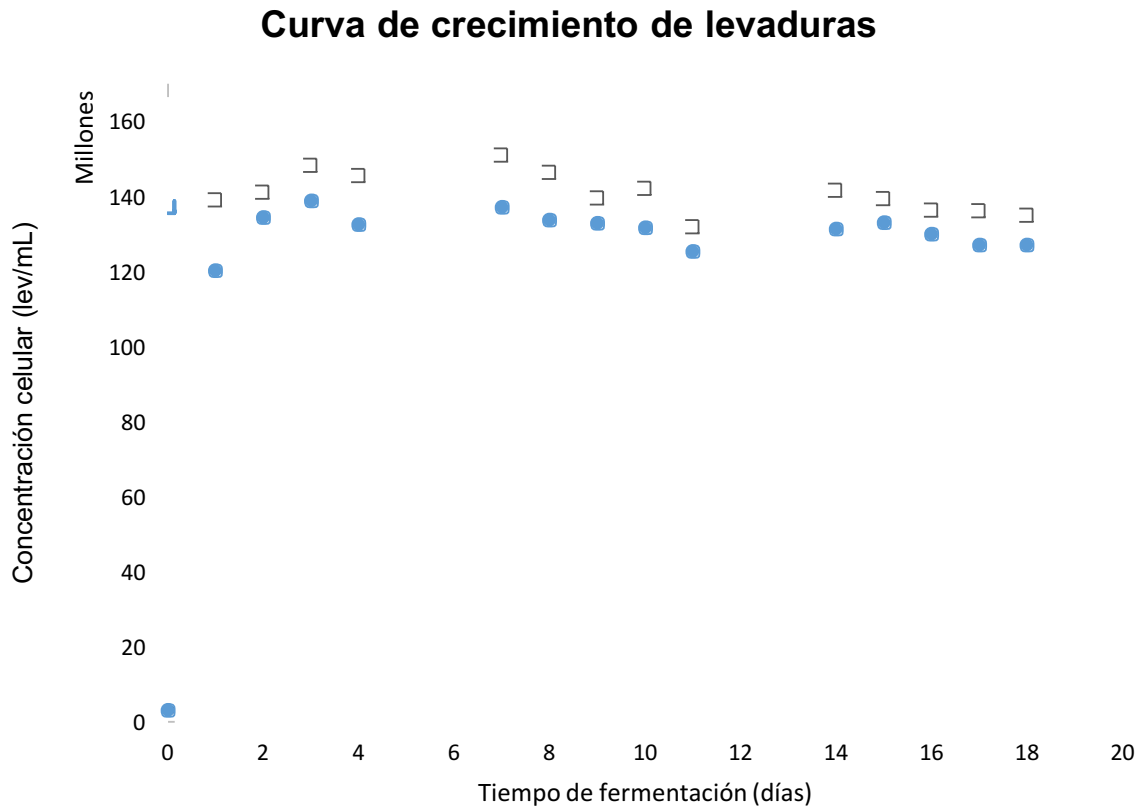


Figura 8. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentación tipo tesgüino. Obtenido con tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar. La velocidad específica de crecimiento obtenida en la fase exponencial del crecimiento es de 3.69 días^{-1} , mientras que el tiempo de duplicación de las levaduras durante ese periodo es de 4.5 horas.

A las 48-72 horas del inicio de la fermentación se alcanzó la fase estacionaria del crecimiento; al llegar a esta fase se obtuvo una concentración de 1.4×10^8 células viables por mililitro de medio de cultivo, y a lo largo de la fase estacionaria la concentración de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyó ligera y gradualmente hasta tener 1.25×10^8 células viables por cada mililitro de medio de cultivo en el día 18, cuando fue interrumpida la fermentación. No se observó una fase de decaimiento microbiano.

4.3 CINÉTICA DE pH

Se analizó el pH del medio de cultivo a lo largo de la fermentación. En la figura 9 se observa el pH de la fermentación medido cada 24 horas.

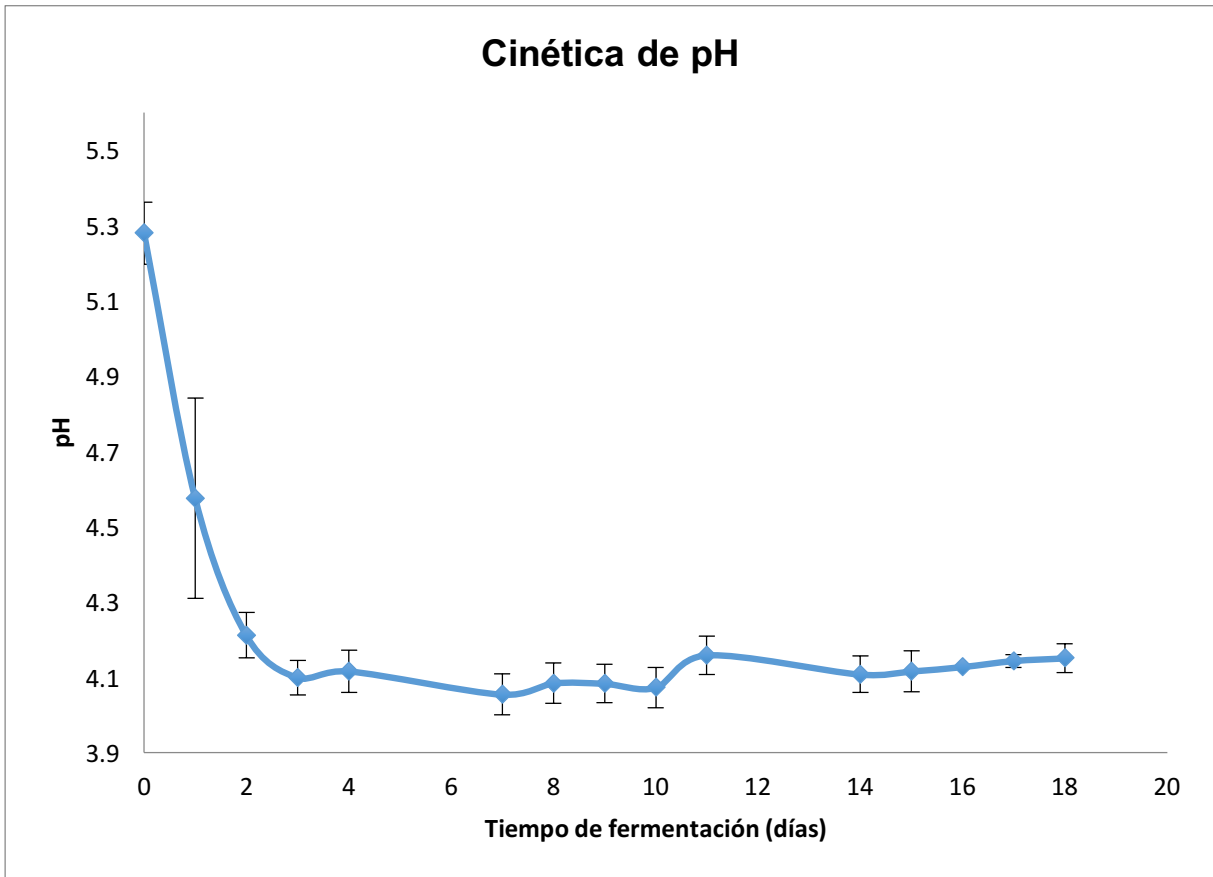


Figura 9. Curva de cambio de pH en la fermentación. Obtenida a partir de tres experimentos independientes.

La fermentación inició con un pH de 5.3 que descendió a un valor de 4.2 a las 24 horas, y en los días subsiguientes varió ligeramente hasta alcanzar un valor de pH de 4.1, que se mantuvo en la fermentación hasta que ésta fue interrumpida.

4.4 AZÚCARES

Se evaluó el consumo de azúcares mediante la medición de azúcares disueltos y de azúcares reductores en el medio de cultivo cada 24 horas.

Mediante refractometría se midió la concentración aproximada de azúcares disueltos a lo largo de la fermentación, como se observa en la figura 10. Al inicio se midió una concentración de azúcares (sacarosa y otros) equivalente a 16.4 grados Brix ($16.4 \text{ g}_{\text{azúcares}} / 100 \text{ g}_{\text{solución}}$, pues $1^\circ\text{Brix} = 1 \text{ g}_{\text{sacarosa}} / 100 \text{ g}_{\text{solución}}$) (Ough 1966a), que se elevó a 20°Brix ($20 \text{ g}_{\text{azúcares}} / 100 \text{ g}_{\text{solución}}$) a las 24 horas de la fermentación, y que fue disminuyendo gradualmente hasta el día 11 de la fermentación, cuando se obtuvo una concentración de 9.32°Brix ($9.32 \text{ g}_{\text{azúcares}} / 100 \text{ g}_{\text{solución}}$).

□

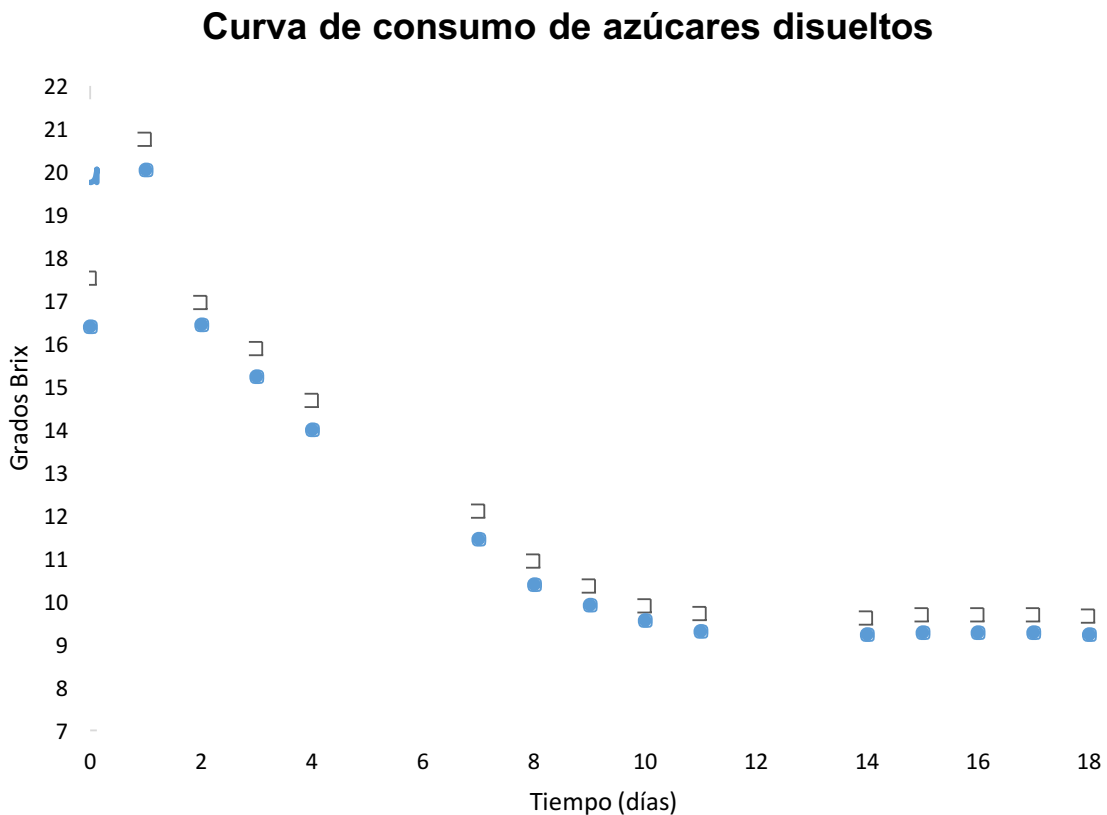


Figura 10. Curva de consumo de azúcares disueltos. Promedio y error estándar de los azúcares disueltos en el medio de cultivo medidos cada 24 horas, obtenido de tres experimentos independientes.

Por otro lado, en la figura 11 se observa la curva de azúcares reductores en el medio de cultivo; al inicio de la fermentación la concentración de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo fue de 104 mg/mL; entre las 24 horas (casi al alcanzar la fase estacionaria, véase figura 8) y el día 7 de la fermentación se observó la mayor tasa de consumo de azúcares reductores, con un valor de $13.137 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{día}^{-1}$, que disminuyó cuando la concentración de estos azúcares se redujo hasta alcanzar una concentración en el medio de cultivo de 12 mg/mL en el día 8.

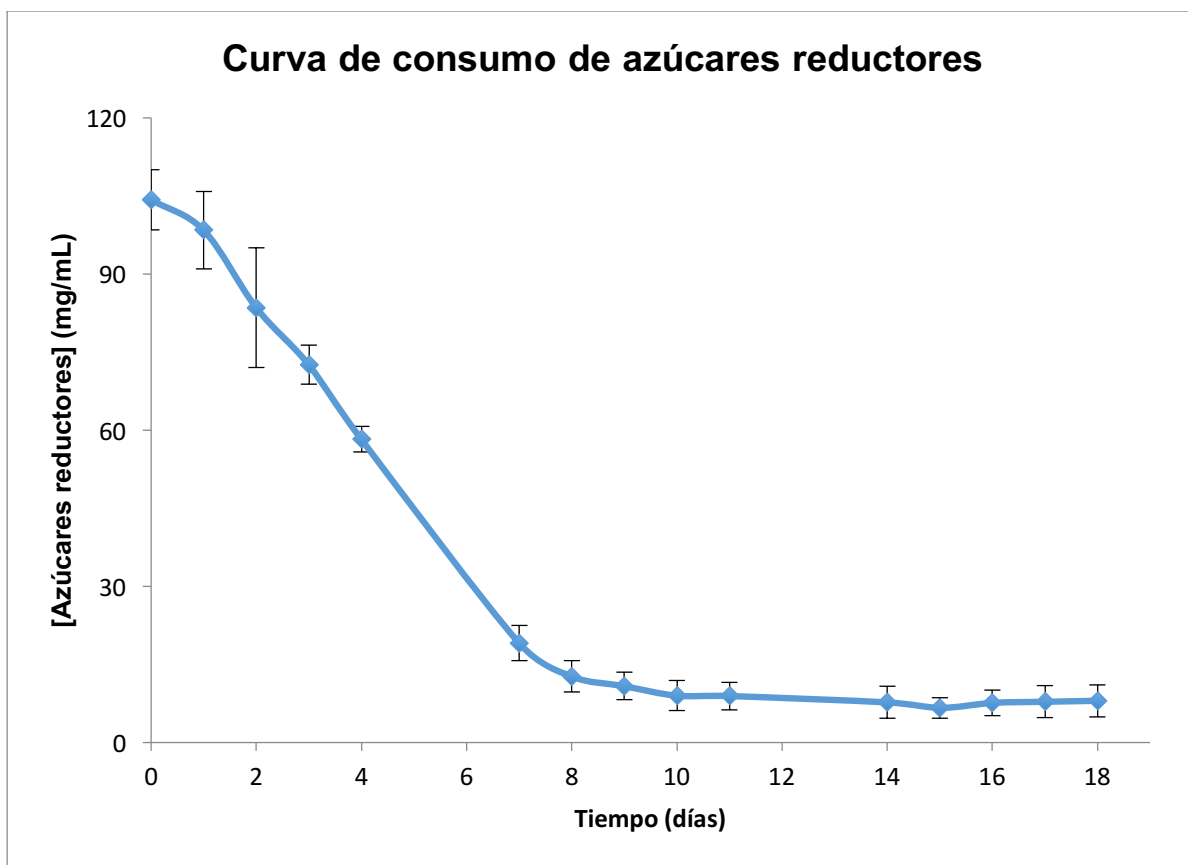


Figura 11. Curva de consumo de azúcares en la fermentación. Obtenida de tres experimentos independientes.

En adelante se observó una tasa de consumo mucho menor, con valor de $0.414 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{día}^{-1}$, hasta tener una concentración de 8 mg/mL en el día 18, cuando se detuvo la fermentación.

4.5 DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO

En la figura 12 se observa la curva de densidad del medio de cultivo durante la fermentación; la densidad inicial del medio tuvo un valor de 1.087 g/cm^3 , y durante los primeros 6 días de la fermentación se observó un descenso sostenido de la densidad antes de llegar a 0.992 g/cm^3 . Enseguida de ese periodo el descenso fue menos perceptible, hasta tener un valor de 0.983 g/cm^3 en el día 18, cuando se detuvo la fermentación.

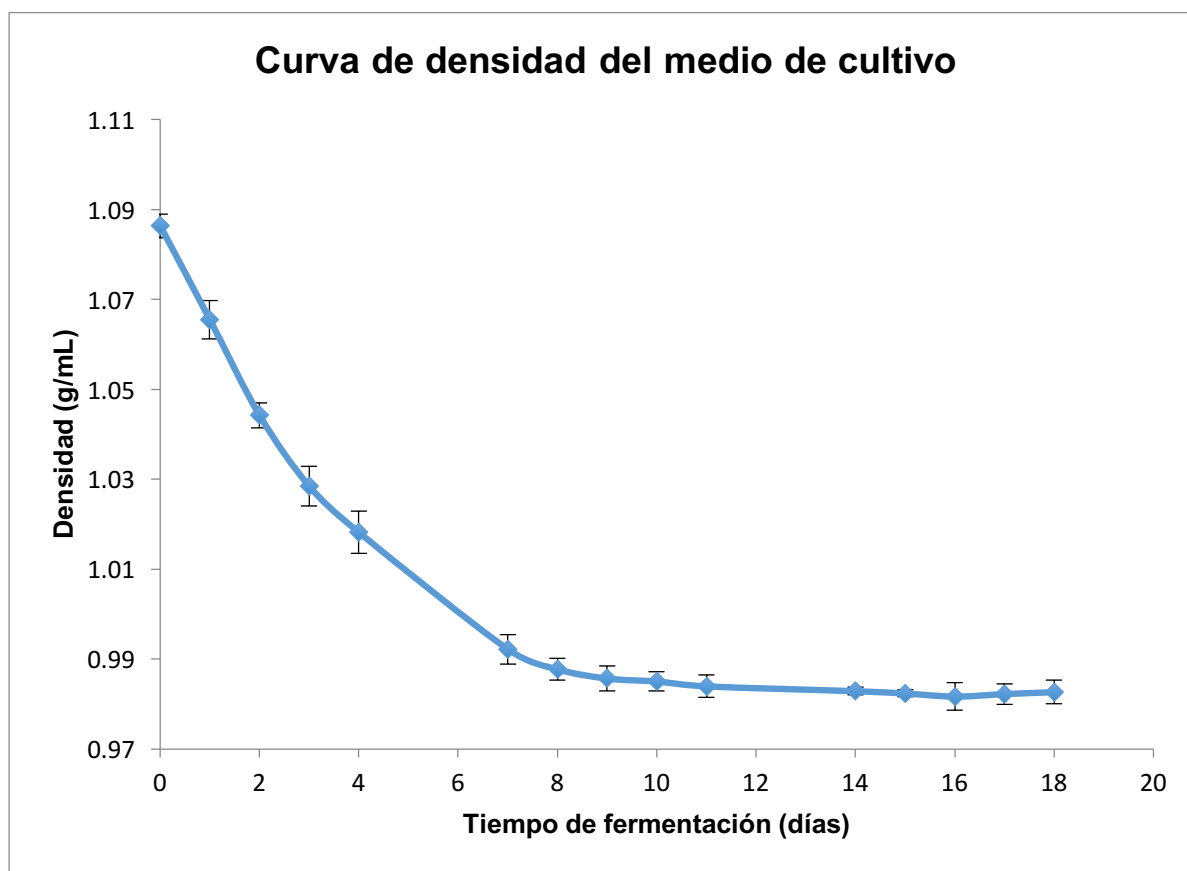


Figura 12. Curva de cambio en la densidad del medio de cultivo. Obtenida de tres experimentos independientes.

4.6 PRODUCCIÓN DE ETANOL

Durante la fermentación se evaluó la producción de etanol. Se midió una concentración de etanol inicial de 0.4% (alc. vol.) que aumentó de manera sostenida hasta los días 7-8 de la fermentación, cuando tuvo un valor de 11.45% (alc. vol.), para luego aumentar levemente durante el resto de la fermentación hasta 12.7 % (alc. vol.), cuando la fermentación fue interrumpida.

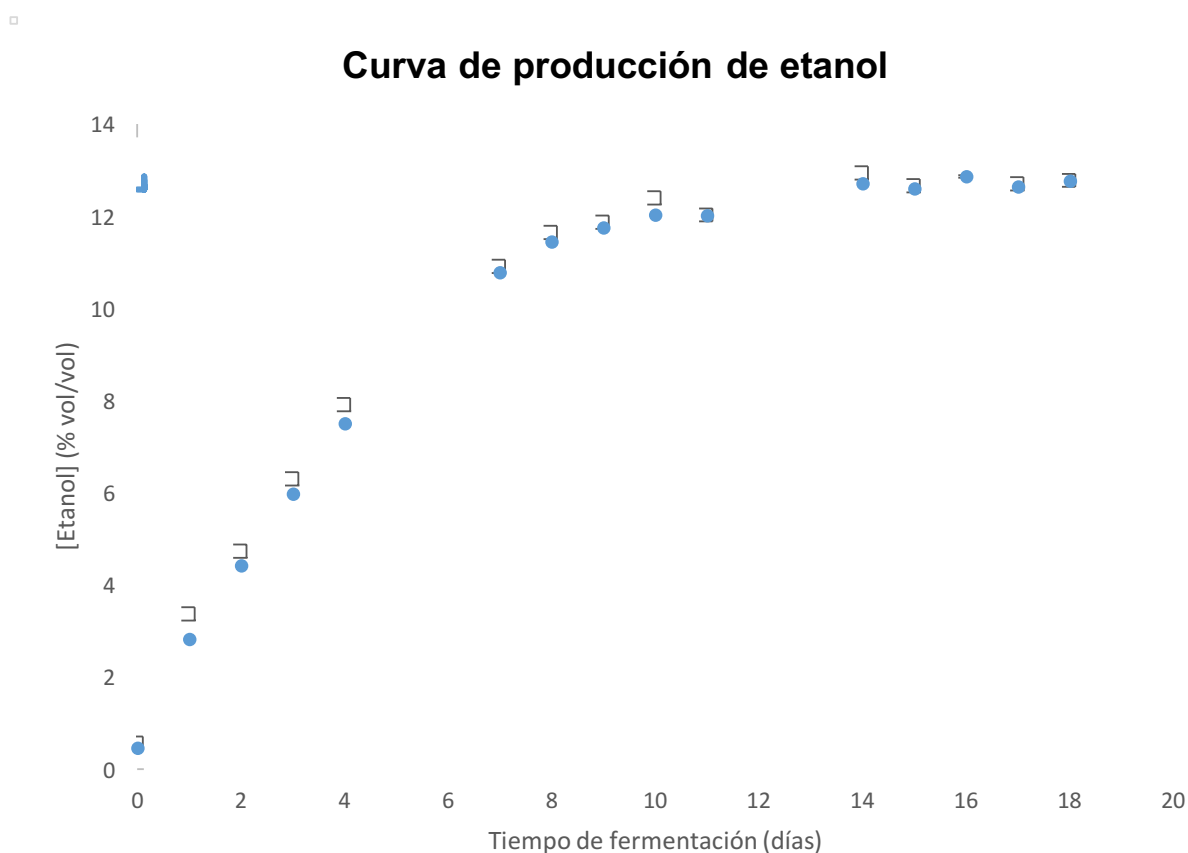


Figura 13. Curva de aparición de etanol en la fermentación. Obtenida de tres experimentos independientes.

4.7 EVALUACIÓN SENSORIAL

La elaboración de una bebida fermentada de maíz plantea la necesidad de evaluar sus propiedades sensoriales ante los posibles consumidores. Para esto se evaluaron cuatro propiedades: el olor, la apariencia, el sabor y la textura de la bebida fermentada.

En la figura 14 se observan las calificaciones dadas por los panelistas a las propiedades de la bebida fermentada; la propiedad mejor evaluada fue el olor, con un valor de 7.2 (gusta moderadamente=7) en una escala del 1 al 9, seguido por la textura con 6.7, luego la apariencia con un valor de 6.24 (gusta ligeramente=6), y finalmente el sabor con un valor de 6.19, en la misma escala.

Evaluación sensorial de la bebida fermentada tipo tesgüino

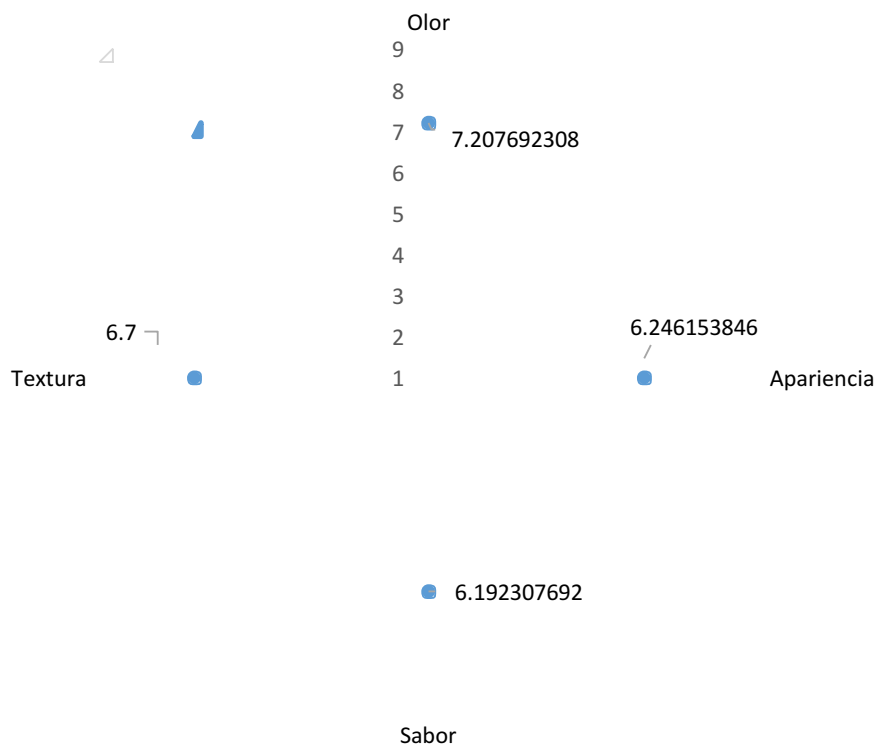


Figura 14. Evaluación sensorial del tesgüino por panelistas no entrenados. 130 panelistas evaluaron el olor, apariencia, sabor y textura de la bebida fermentada obtenida bajo una escala hedónica.

En la tabla 2 y en la figura 15 están registradas las frecuencias con las que fueron evaluadas las propiedades sensoriales del tesgüino; allí se observan los datos crudos de calificación dada por los panelistas no entrenados a las cuatro características evaluadas.

Tabla 2. Evaluación sensorial de la bebida fermentada tipo tesgüino.

	Olor	Apariencia	Sabor	Textura	
	<i>Frecuencias</i>				<i>Sumas</i>
Disgusta extremadamente	0	0	1	1	2
Disgusta mucho	0	1	5	0	6
Disgusta moderadamente	0	0	8	1	9
Disgusta ligeramente	4	7	11	5	27
Ni gusta ni disgusta	7	33	12	25	77
Gusta ligeramente	23	29	24	22	98
Gusta moderadamente	35	39	35	29	138
Gusta mucho	46	19	29	36	130
Gusta extremadamente	15	2	5	11	33
Total	130	130	130	130	520

Se observa que las cuatro propiedades sensoriales recibieron un mayor número de calificaciones positivas: 'gusta ligeramente' 98, 'gusta moderadamente' 138, 'gusta mucho' 130 y 'gusta extremadamente' 33; estas calificaciones, en conjunto, representan el 77% de las 520 calificaciones registradas; mientras que las calificaciones neutras ('ni gusta ni disgusta') fueron el 15%, y las calificaciones negativas ('disgusta extremadamente', 'disgusta mucho', 'disgusta moderadamente' y 'disgusta ligeramente') representaron el 8% restantes.

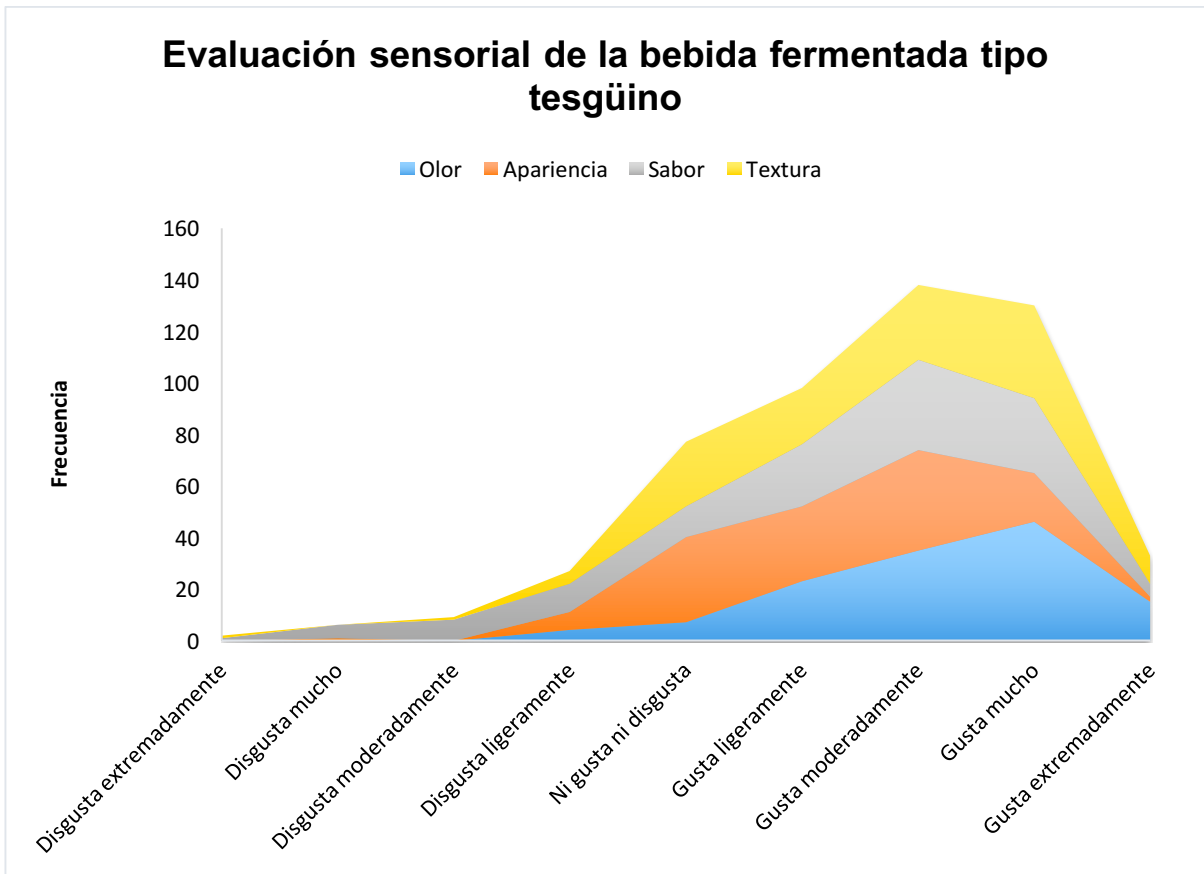


Figura 15. Evaluación sensorial del tesgüino por panelistas no entrenados. 130 panelistas evaluaron el olor, apariencia, sabor y textura de la bebida fermentada obtenida bajo una escala hedónica. Se registran las frecuencias apiladas.

5. DISCUSIÓN

5.1 IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA DE LEVADURA

Se esperaba que la identificación de la cepa empleada en la fermentación correspondiera a una levadura del genero *Saccharomyces*, y así resultó. Respecto a la especie (cuestión de mayor incertidumbre) se pudo determinar que esta pertenece a la especie *cerevisiae*. A pesar de que no se pudo identificar una cepa con el 100% de identidad, pues el resultado de mayor similitud genética fue de 95% (véase anexo A), se obtuvo una identificación satisfactoria, que sirve para la ubicación taxonómica de la cepa utilizada, lo cual es aceptable, ya que en fermentaciones tradicionales se ha observado una gran variabilidad genética de las cepas empleadas (Flores Henry 2006).

5.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

La cinética de crecimiento observada corresponde a la cinética de crecimiento esperada, iniciando con la fase exponencial debido al uso de la semilla de fermentación. Con esta curva de crecimiento microbiano se obtuvo el tiempo en el que se alcanza la fase estacionaria del crecimiento (48-72 horas) y la concentración celular esperada en la fase estacionaria (1.4×10^8 cél/mL) con las condiciones establecidas durante la elaboración de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino.

En el estudio de Lappe Oliveras (1988) se observó que el principal inóculo de la fermentación del tesgüino tradicional fue el sedimento de las ollas tesgüíneas, y que la población de *S. cerevisiae* es predominante hasta las 50 horas de la fermentación, cuando alcanza una concentración de 8.9×10^{11} UFC/mL, seguida de *Candida guilliermondii*, la cual tiene una concentración de 2×10^{10} UFC/mL, mientras

hay una concentración de etanol de 3.73 por ciento y un pH de 3.0. El protocolo actual produce una fermentación con una menor concentración celular (1.4×10^8 cél/mL) en comparación con el tesgüino tradicional (8.9×10^{11} UFC/mL), posiblemente debido a que en el actual trabajo no hay microorganismos competidores que ocasionen una mayor concentración celular de *Saccharomyces cerevisiae* antes de que esta especie predomine y cause el arresto celular de las otras especies (Nissen, Nielsen y Arneborg 2003).

Por otro lado se ha reportado que en fermentaciones con alta densidad celular se alcanzan concentraciones con orden de 1×10^8 UFC/mL (Pereira et al. 2013), por lo que la concentración celular obtenida por el actual trabajo se corresponde con otras fermentaciones reportadas en la literatura, donde también se ha reportado que la concentración de sacarosa empleada en el medio (200 g/L. véase figura 10) y el pH obtenido en la fermentación (4.1, véase figura 9) han sido reportados como favorables para obtener un elevado crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Charoenchai, Fleet y Henschke 1998).

En el caso del tesgüino tradicional, antes de que *Saccharomyces cerevisiae* sea predominante, se pueden generar compuestos con posibles efectos nocivos a la salud del consumidor producidos por bacterias contaminantes; Lappe Oliveras (1988) determinó la presencia de especies de *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, que podrían producir compuestos que representen un riesgo potencial a la salud de los consumidores, como Ochratoxina A y aminos biogénicas (Fabien Cousin et al. 2017; Russo et al. 2016). Es posible que conforme avance la fermentación tales agentes infecciosos sean eliminados por compuestos antibacterianos generados por *S. cerevisiae* (Albergaria y Arneborg 2016), o por las duras condiciones del medio de cultivo, que incluyen un bajo pH de 3.0 (Lappe Oliveras 1988), sin embargo, se puede considerar favorable el uso de un inóculo puro para evitar tales riesgos a la salud del consumidor.

El uso de una densidad celular inicial de 1×10^6 cél/mL favorece una producción mayor de compuestos aromáticos como los fenoles volátiles y los ácidos grasos volátiles que dan un olor y sabor característicos a las bebidas fermentadas (Pereira et al. 2013), y se reduce la posibilidad de que el medio de cultivo se contamine con bacterias u hongos (Lodolo et al. 2008; Okafor 2016; Albergaria y Arneborg 2016), con lo que se obtienen ventajas para la obtención de una bebida inocua y con mejores cualidades olfativas y gustativas.

Ante esa perspectiva el presente protocolo de fermentación elimina el riesgo de daños a la salud generados por posibles bacterias contaminantes (Lodolo et al. 2008), ya que la fermentación se mantiene libre de tales agentes infecciosos y alcanza su mayor densidad a las 48-72 horas de la fermentación, permitiendo la generación de mecanismos antimicrobianos por parte de *Saccharomyces cerevisiae*, y reduce el riesgo de descomposición de la bebida fermentada al utilizar un cultivo con una cepa pura (Lodolo et al. 2008; Albergaria y Arneborg 2016).

5.3 CINÉTICA DE pH

La curva de cambio de pH obtenido en la fermentación tiene la tendencia que se esperaba (Figura 9), ya que a medida que aumentó la concentración celular de *Saccharomyces cerevisiae* disminuyó el pH, dándose el mayor descenso del pH durante la fase exponencial del crecimiento de las levaduras (Figura 8), lo cual coincide al periodo durante el cual el metabolismo produjo una gran cantidad de ácidos orgánicos, como ácido acético, ác. succínico, ác. láctico y ác. pirúvico, y absorbió los aminoácidos básicos, bajando el pH del medio de cultivo (Coote y Kirsop 1976).

Con esta disminución del pH del medio *S. cerevisiae* favoreció su dominio en el medio de cultivo ante una posible contaminación de bacterias y otras levaduras, ya que a un valor de pH bajo la concentración de H_3O^+ impide el

crecimiento de muchos microorganismos contaminantes, como los lactobacilos. De igual manera la temperatura que se utilizó en la fermentación fue un factor favorable para que *Saccharomyces cerevisiae* dominara sobre otras especies de levaduras en caso de contaminación (Hui et al. 2004; Albergaria y Arneborg 2016).

El pH de la bebida fermentada obtenida es mayor en comparación con el pH del tesgüino tradicional, que tiene un valor de pH de 3.0 a las 36 horas de fermentación (Lappe Oliveras 1988), es posible que esta diferencia en el valor del pH tenga relación con la inoculación con un cultivo puro, y con que en el tesgüino tradicional la existencia de un inóculo heterogéneo origina que las levaduras que luchan por predominar disminuyan el pH aún más para combatir a las otras especies microbianas presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, el pH de 4.1 obtenido en la bebida fermentada del presente trabajo favorece una alta densidad celular (Charoenchai, Fleet y Henschke 1998) y tiene semejanza al pH reportado para otras bebidas fermentadas producidas en todo el mundo. En otras cervezas tradicionales como las cerveza de sorgo y de maíz sudafricanas el pH reportado es de 3.0 - 4.0 (Steinkraus 2004), para el Ogi nigeriano el pH es de 4.0 - 4.2, mientras que en vinos de mesa el pH reportado es de 3.0-4.0 (Warrick 2010).

5.4 AZÚCARES

La concentración aproximada de azúcares equivalentes a sacarosa disueltos en el medio de cultivo medidos a través de refractometría (figura 10) se elevó desde el inicio hasta las 24 horas de la fermentación debido a que al inicio había material sólido que no estaba disuelto, como granos de maíz y pequeños trozos de piloncillo, y con el desarrollo de la fermentación fueron disgregándose y disolviéndose con ayuda de la agitación y demás condiciones de la fermentación. Mediante esta técnica se miden los azúcares disueltos, sin embargo, también se miden otros compuestos presentes en el medio de cultivo, y en la fermentación hay una gran

cantidad de compuestos disueltos, así que, aunque se obtuvo la tendencia del consumo de azúcares equivalentes a sacarosa, esta medida es aproximada.

Si bien el medio de cultivo fue preparado con piloncillo como fuente de azúcares en una proporción de 300 g/L, la concentración de equivalentes de sacarosa medida en el medio de cultivo a través de refractometría fue de 20 °Brix (20 g_{azúcares}/100 g_{solución}), lo que equivale a 250g de sacarosa por litro de medio de cultivo; esta concentración ha sido reportada como favorable para obtener una tasa alta de crecimiento específico y una mayor densidad celular máxima (Charoenchai, Fleet y Henschke 1998), con lo que se favorece un desarrollo más rápido de la fermentación para obtener una bebida tipo tesgüino.

En el caso de la cuantificación de azúcares reductores (figura 11), el tratamiento dado a las muestras incluyó calentamiento y adición de ácidos sulfúrico y dinitrosalicílico, con lo que la mayoría de las pequeñas partículas de piloncillo y del medio de cultivo se disgregaron y se disolvieron, por lo que no se observa una curva semejante a la curva de azúcares disueltos en el inicio de la fermentación (Figura 10), sino que hubo una concentración desde el inicio de la fermentación y después un descenso de la concentración de azúcares reductores conforme avanzaba la fermentación.

Una vez que la fermentación alcanzó su mayor densidad celular y entró a la fase estacionaria (Pereira et al. 2013) aún quedaba una concentración alta de azúcares (figuras 10 y 11), sin embargo, no se siguió produciendo biomasa, sino que en su lugar se continuó produciendo etanol, gracias al efecto Crabtree, el cual le permite a la levadura continuar con el metabolismo de los azúcares en ausencia de oxígeno (Albergaria y Arneborg 2016).

El mayor descenso en la concentración de azúcares disueltos equivalentes a sacarosa y de azúcares reductores se dio en los primeros ocho días de la fermentación (figuras 10 y 11), lo cual coincide con el periodo durante el cual se dio

la mayor producción de etanol (figura 13) y con la mayor disminución de la densidad del medio de cultivo (figura 12).

Es importante mencionar que el tesgüino tradicional tiene un periodo de fermentación desde doce horas hasta varios días y que en su preparación sólo se involucra maíz como fuente de azúcares (Lappe Oliveras 1988), mientras que en este protocolo la fermentación duró más tiempo (18 días) y se adicionó piloncillo como fuente de azúcares, por lo que en el tesgüino tradicional la concentración de azúcares al inicio de la fermentación es menor que la concentración de azúcares en el actual protocolo, y debido a esto cambia la cantidad de etanol que es posible producir en ambas fermentaciones, puesto que la adición de azúcares en el protocolo propuesto incrementa su disponibilidad y con ello aumenta la cantidad de etanol que puede producirse en la fermentación (Charoenchai, Fleet y Henschke 1998; Arroyo-López et al. 2009).

5.5 DENSIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO

Al inicio de la fermentación, el medio de cultivo era una mezcla de diversos sólidos y compuestos como los granos germinados de maíz, pequeñas partículas de piloncillo y sacarosa por lo que se esperaba una densidad mayor a la densidad del agua (0.9985 g/cm^3 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), pues sólo la presencia de sacarosa disuelta podría aumentar la densidad de una mezcla binaria a 1.0816 g/cm^3 con $20 \text{ }^\circ\text{Brix}$ ($20 \text{ g}_{\text{sacarosa}}/100 \cdot \text{g}_{\text{solución}}$) a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Zavaleta Mercado 2011); la densidad obtenida fue de 1.087 g/cm^3 , que es un valor muy cercano al de la mezcla binaria y a la densidad de 1.080 g/cm^3 obtenido al inicio de fermentaciones vinícolas (Valdés 2012).

Se esperaba que la densidad disminuyera conforme se desarrollara la fermentación como efecto del consumo de sacarosa y de la producción de etanol; aunque es la producción de etanol lo que más impacto tiene en la disminución de la densidad del medio de cultivo; los reportes indican que una mezcla binaria 10%

(vol/vol) etanol + agua tiene una densidad de 0.9597 g/cm^3 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Madrid Úsuga, Urango Baquero y Portacio Lamadrid 2015), la cual tiene un valor inferior a la densidad del agua pura (0.9985 g/cm^3 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

En este protocolo de fermentación la producción de etanol superó el 10%, sin embargo, la densidad medida al final de la fermentación fue de 0.982 g/cm^3 ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), que es una densidad mayor a la de la mezcla binaria. En otras fermentaciones, como las vinícolas, la densidad reportada al final de la fermentación (día 15) es de 0.997 g/cm^3 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Valdés 2012), que también es una densidad con un valor superior al de la mezcla binaria y tiene un valor semejante al obtenido en este protocolo; esto se debe a que las fermentaciones son mezclas muy complejas donde hay muchos compuestos que modifican su densidad, y ésta no está determinada únicamente por la presencia de etanol.

El cambio en la densidad del medio de cultivo corresponde a los valores esperados, ya que el mayor descenso de la densidad ocurrió entre el inicio y el día 7 de la fermentación (figura 12), lo cual coincide con el periodo durante el cual ocurrió el mayor descenso de los azúcares (figuras 10 y 11) y con el periodo donde ocurrió la mayor producción de etanol (figura 13).

5.6 PRODUCCIÓN DE ETANOL

En esta fermentación se obtuvo una concentración de etanol de 12.7%, que es mayor a la concentración de etanol del tesgüino tradicional, que es de 3.73% a las 36 horas de fermentación (Lappe Oliveras 1988), sin embargo, en este protocolo se esperaba un nivel de producción de etanol mayor que en el tesgüino tradicional, ya que el medio de cultivo tiene un contenido de azúcares mayor ($20 \text{ }^\circ\text{Brix}$, véase figura 10) porque se agregó piloncillo al medio de cultivo como fuente de azúcares, a diferencia del tesgüino tradicional, en el cual es menos frecuente que se adicione algún tipo de fuente de azúcares adicional (Bruman 2000); La adición de azúcares

incrementó el metabolismo de las levaduras para producir más etanol (Casey, Magnus y Ingledew 1984), tal como se ha reportado para fermentaciones con nivel inicial de azúcares equivalentes a 20 °Brix, con cepas indígenas de *Saccharomyces cerevisiae*, donde se ha obtenido una producción de 11-12% alc. vol. (Ough 1966b).

En este protocolo se optimizaron las condiciones generales de la fermentación, como la temperatura (30 °C), la agitación (400 - 200 rpm), el uso de una cepa pura de *S. cerevisiae* como inóculo, la concentración celular inicial (1×10^8 cél/mL), un medio de cultivo con mayor contenido de azúcares (20 °Brix), se aumentó el tiempo de fermentación hasta 18 días; el conjunto de estos elementos favoreció la producción de más etanol en la bebida fermentada.

La mayor producción de etanol en la bebida fermentada producida con el actual protocolo de fermentación garantiza la predominancia de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación se reduce la probabilidad de que haya contaminación de las especies que causan la descomposición de la cerveza, dando a la bebida una vida de anaquel mucho mayor a la que tiene la bebida tradicional.

En los gráficos de densidad del medio de cultivo (figura 12), de azúcares equivalentes a sacarosa (figura 10), azúcares reductores (figura 11) y de producción de etanol (figura 13) se observa que la producción de etanol se detiene o alenta cuando se agotan los azúcares presentes en el medio, llegando a una concentración de 12 mg/mL de azúcares reductores, luego de eso la producción continúa a una tasa menor, indicando una disminución en el metabolismo, disminución de nutrientes, o posiblemente que se alcanzó el límite al cual esta cepa de levaduras tolera el etanol.

Uno de los limitantes principales para la producción de cervezas con alto contenido alcohólico es el nivel de nutrientes del medio de cultivo, Casey, Magnus e Ingledew (1984) demostraron que una cerveza podía llegar a un nivel de etanol de hasta 16.2% al adicionar suplementos nutricionales al medio de cultivo, ya que

las cervezas con mayor contenido de etanol contenían 7% de alcohol. En el caso del tesgüino tradicional, la fuente principal de azúcares, nitrógeno y otros nutrientes está en los contenidos en la malta de maíz (Lappe Oliveras 1988), por lo que la adición de piloncillo agrega más nutrientes al medio de cultivo, sin embargo, el contenido de estos nutrientes es una variable que se puede optimizar en el futuro.

5.7 *EVALUACIÓN SENSORIAL*

Se obtuvo una bebida fermentada de maíz descriptivamente semejante al tesgüino tradicional, ya que la bebida fermentada es un líquido color café claro con un sabor ligeramente ácido y refrescante (Nava Arenas 2010). Adicionalmente a la caracterización descriptiva se realizó una evaluación sensorial con escala hedónica donde se registró el gusto o preferencia por el olor, sabor, apariencia y textura de la bebida fermentada de maíz obtenida de un grupo de panelistas no entrenados, sólo que el resultado de esta evaluación es de difícil comparación debido a que hasta ahora no ha habido una evaluación sensorial que valore el gusto por las propiedades sensoriales de la bebida tradicional.

En el desarrollo de este protocolo de fermentación se realizaron varias modificaciones en la preparación de la bebida fermentada de maíz con respecto al tesgüino tradicional, como el aumento en la cantidad de azúcares en el medio de cultivo y el monocultivo del inóculo de fermentación, por lo que se esperaba que hubiera cambios en las propiedades sensoriales de la bebida obtenida.

La filtración de la bebida obtenida a través de algodón redujo el número de partículas de manera visible, y esto se vio reflejado en la apariencia, que fue evaluada como 'gusta ligeramente', así como en la textura, que fue evaluada como 'gusta moderadamente'. La fermentación bajo las condiciones de trabajo (monocultivo, densidad celular al inicio de la fermentación) generó una mayor producción de compuestos volátiles, como fenoles y ácidos grasos, que dio un olor

muy agradable a la bebida fermentada (Pereira et al. 2013), esto se vio reflejado en la evaluación sensorial de olor y del sabor, donde ambas características fueron calificadas como 'gusta moderadamente'.

La bebida fermentada obtenida tiene un gran potencial para ser desarrollada a nivel industrial, ya que con este protocolo de fermentación se registró un 77% de calificaciones positivas (véase tabla 2 y figura 15) y únicamente el 8% de las valoraciones dadas por los panelistas que evaluaron la bebida fueron calificaciones negativas. La evaluación sensorial fue realizada entre personas elegidas al azar, de las que no se conoce el gusto o desagrado por las bebidas fermentadas en general, por lo que la obtención de las presentes evaluaciones positivas de la bebida fermentada es un indicador de que es bien recibida por la población en general y que se puede continuar con el desarrollo de esta bebida, mejorando cada una de las propiedades evaluadas.

Bruman (2000) y Lappe Oliveras (1988) observaron que el sabor característico del tesgüino está determinado por la mezcla de maíces utilizada para su preparación, y en este protocolo se utilizó una mezcla de maíces amarillo y pozolero, de donde al menos el maíz amarillo ha sido empleado en la elaboración del tesgüino tradicional (Bruman 2000) por lo que una parte de las propiedades sensoriales dependen de esta mezcla, y el conocimiento y el uso de nuevas mezclas de variedades de maíz puede permitirnos el manejo y mejoramiento de las propiedades sensoriales del tesgüino.

6. CONCLUSIONES

De entre las bebidas fermentadas tradicionales el tesgüino tiene un papel importante, ya que es utilizado en festividades por grupos indígenas del norte y occidente de México. Debido a la importancia que tiene esta bebida tradicional se considera valioso el desarrollo de un protocolo de elaboración de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino en condiciones de laboratorio de enseñanza.

Se establecieron condiciones de fermentación para la obtención de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino para su uso como protocolo de fermentación en condiciones de un laboratorio de enseñanza; para esto se establecieron condiciones para la preparación del medio de cultivo, configuración del biorreactor, esterilización, agitación, control de temperatura, aireación, preparación del inóculo e inoculación, toma, tratamiento y análisis de muestras.

Se identificó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* originaria de una zona mezcalera de Oaxaca; se utilizó un monocultivo de esta cepa como inóculo en el protocolo para la obtención de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino con resultados óptimos, reduciendo la probabilidad de contaminación por parte de microorganismos que pueden ocasionar la descomposición de la bebida.

Se obtuvo la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*, la curva de consumo de azúcares, la curva de producción de etanol, la curva del cambio del pH, la curva del cambio de densidad del medio de cultivo, con lo que se puede optimizar las condiciones de fermentación para la producción de la bebida fermentada.

Se obtuvo una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino que fue evaluada por panelistas no entrenados por tener buen olor (gusta moderadamente, 7.2 en escala hedónica del 1-9), seguido por buena textura (gusta moderadamente, 6.7),

buena apariencia (gusta ligeramente, 6.24) y buen sabor (gusta ligeramente, 6.19, misma escala).

La bebida elaborada es aceptada por el público, y la optimización de la fermentación puede mejorar esta aceptación. Este protocolo sienta las bases para el desarrollo industrial de una bebida fermentada de maíz tipo tesgüino.

7. REFERENCIAS

- ACUÑA DELGADO, Á., 2005. Rarámuri Matachines (Mexico). A process of cultural syncretism. *Gazeta de Antropología*, no. 21.
- ALBERGARIA, H. y ARNEBORG, N., 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 5, pp. 2035–2046. DOI 10.1007/s00253-015-7255-0.
- ALBERGARIA, H., BRANCO, P., FRANCISCO, D., MONTEIRO, M., MALFEITO-FERRERA, M., ARNEBORG, N., ALMEIDA, M.G. y CALDEIRA, J., 2013. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentations: secretion of antimicrobial peptides and microbial interactions. *2nd International Conference on Microbial Diversity Microbial interactions in complex ecosystems*, pp. 98–101.
- ALBERGARIA, H., FRANCISCO, D., GORI, K., ARNEBORG, N. y GÍRIO, F., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, no. 3, pp. 965–972. DOI 10.1007/s00253-009-2409-6.
- ARROYO-LÓPEZ, F.N., ORLIĆ, S., QUEROL, A. y BARRIO, E., 2009. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, no. 2-3, pp. 120–127. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035.
- BRUMAN, H.J., 2000. *Alcohol in Ancient Mexico*. S.I.: University of Utah Press.
- CASEY, G.P., MAGNUS, C.A. y INGLEDEW, W.M., 1984. High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production
. *aem.asm.org*, vol. 48.
- CHAMBERS, P.J. y PRETORIUS, I.S., 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO reports*, vol. 11, no. 12, pp. 914–920. DOI 10.1038/embor.2010.179.
- CHAROENCHAI, C., FLEET, G.H. y HENSCHKE, P.A., 1998. Effects of temperature, ph, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeast. *American Society for Enology and Viticulture*, vol. 49, no. 3, pp. 283–288.

- CHEN, C.-H., WU, Y.-L., LO, D. y WU, M.-C., 2013. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 119, no. 4, pp. 303–308. DOI 10.1002/jib.95.
- CHRISTIAENS, J.F., FRANCO, L.M., COOLS, T.L., DE MEESTER, L., MICHIELS, J., WENSELEERS, T., HASSAN, B.A., YAKSI, E. y VERSTREPEN, K.J., 2014. The Fungal Aroma Gene ATF1 Promotes Dispersal of Yeast Cells through Insect Vectors. *CellReports*, vol. 9, no. 2, pp. 425–432. DOI 10.1016/j.celrep.2014.09.009.
- CIANI, M. y MACCARELLI, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 14, no. 2, pp. 199–203. DOI 10.1023/A:1008825928354.
- COMITINI, F., FERRETTI, R., CLEMENTI, F., MANNAZZU, I. y CIANI, M., 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 99, no. 1, pp. 105–111. DOI 10.1111/j.1365-2672.2005.02579.x.
- COOTE, N. y KIRSOP, B.H., 1976. FACTORS RESPONSIBLE FOR THE DECREASE IN pH DURING BEER FERMENTATIONS. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 82, no. 3, pp. 149–153. DOI 10.1002/j.2050-0416.1976.tb03739.x.
- DASHKO, S., ZHOU, N., COMPAGNO, C. y PIŠKUR, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, vol. 14, no. 6, pp. 826–832. DOI 10.1111/1567-1364.12161.
- EBELER, S.E., 2001. Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food reviews international*, vol. 17, no. 1, pp. 45–64.
- EL COLEGIO DE MÉXICO, A. C., 2017. Diccionario del Español de México. *dem.colmex.mx* [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2017]. Disponible en: <http://dem.colmex.mx/Default.aspx>.
- ERAM, M.S. y MA, K., 2013. Decarboxylation of pyruvate to acetaldehyde for ethanol production by hyperthermophiles. *Biomolecules*, vol. 3, no. 3, pp. 578–596. DOI 10.3390/biom3030578.
- ESCALANTE, A., LÓPEZ SOTO, D.R., VELÁZQUEZ GUTIÉRREZ, J.E., GILES-GÓMEZ, M., BOLÍVAR, F. y LÓPEZ-MUNGUÍA, A., 2016. Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, pp. 1026. DOI 10.3389/fmicb.2016.01026.

- FABIEN COUSIN, ROZENN LE GUELLEC, MARGOT SCHLUSSELHUBER, MARION DALMASSO, JEAN-MARIE LAPLACEMARINA CRETENET, 2017. Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms*, vol. 5, no. 3, pp. 39. DOI 10.3390/microorganisms5030039.
- FERREIRA, I.M.P.L.V.O., PINHO, O., VIEIRA, E. y TAVARELA, J.G., 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, no. 2, pp. 77–84. DOI 10.1016/j.tifs.2009.10.008.
- FLORES HENRY, A., 2006. *Caracterización genética de cepas de levaduras aisladas de mezcal*. S.l.: Flores Henry, Antonio. ISBN 123456789.
- GARIBAY, M.G., RAMÍREZ, R.Q. y CANALES, A.L.-M., 1993. *Biotechnología alimentaria*. S.l.: Editorial Limusa. ISBN 9789681845223.
- GOBBI, M., COMITINI, F., DOMIZIO, P., ROMANI, C., LENCIONI, L., MANNAZZU, I. y CIANI, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, vol. 33, no. 2, pp. 271–281. DOI 10.1016/j.fm.2012.10.004.
- GODOY, A., HERRERA, T. y ULLOA, M., 2003. *Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. S.l.: UNAM. ISBN 9789703206384.
- HERRERA, T. y ULLOA, M., 1976. *Pichia membranaefaciens* y su estado asexual, *Candida valida*, aisladas del tesguino de Chihuahua, México. S.l.: s.n. ISBN 0374-5511.
- HUI, Y.H., MEUNIER-GODDIK, L., JOSEPHSEN, J., NIP, W.-K. y STANFIELD, P.S., 2004. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. S.l.: CRC Press. ISBN 0824751221.
- JYOTI PRAKASH TAMANG, K.K., 2010. Fermented Foods and Beverages of the World, pp. 1–445.
- KEMSAWASD, V., BRANCO, P., ALMEIDA, M.G., CALDEIRA, J., ALBERGARIA, H. y ARNEBORG, N., 2015. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 362, no. 14, pp. fnv103. DOI 10.1093/femsle/fnv103.
- KENNEDY, J.G., 1963. Tesguino Complex: The Role of Beer in Tarahumara Culture. *American Anthropologist*, vol. 65, no. 3, pp. 620–640.
- LAPPE OLIVERAS, M.E., 1988. *Estudios étnicos, microbianos y químicos del*

- Tesguino Tarahumara*. S.I.: UNAM.
- LAPPE, P. y ULLOA, M., 1989. *Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesguino tarahumara*. S.I.: UNAM.
- LODOLO, E.J., KOCK, J.L.F., AXCELL, B.C. y BROOKS, M., 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 7, pp. 1018–1036. DOI 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x.
- MADRID ÚSUGA, D., URANGO BAQUERO, M.P. y PORTACIO LAMADRID, A., 2015. Propiedades volumétricas de soluciones acuosas de etanol y [Emim]⁺[CF₃SO₃]⁻ a partir de datos de índice de refracción. *CIENCIA EN DESARROLLO*, vol. 6, no. 2, pp. 231–240. DOI 10.19053/01217488.3794.
- MASON, R. y NOTTINGHAM, S., 2002. *Sensory evaluation manual*. S.I.: University of Queensland Australia.
- MORENO-ARRIBAS, M.V. y POLO, M.C., 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, NY: Springer New York. ISBN 978-0-387-74116-1.
- MORGULIS, A., COULOURIS, G., RAYTSELIS, Y., MADDEN, T.L., AGARWALA, R. y SCHÄFFER, A.A., 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, vol. 24, no. 16, pp. 1757–1764. DOI 10.1093/bioinformatics/btn322.
- NAVA ARENAS, D., 2010. *Estudio de cambios estructurales y en algunos compuestos fenólicos durante la elaboración de Tesguino de maíz azul (Zea mays)*. S.I.: s.n.
- NEHME, N., MATHIEU, F. y TAILLANDIER, P., 2010. Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiology*, vol. 27, no. 1, pp. 150–157. DOI 10.1016/j.fm.2009.09.008.
- NISSEN, P. y ARNEBORG, N., 2003. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, vol. 180, no. 4, pp. 257–263. DOI 10.1007/s00203-003-0585-9.
- NISSEN, P., NIELSEN, D. y ARNEBORG, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, vol. 20, no. 4, pp. 331–341. DOI 10.1002/yea.965.
- OKAFOR, N., 2016. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. S.I.: CRC Press. ISBN 1439843236.

- OSBORNE, J.P. y EDWARDS, C.G., 2007. Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 118, no. 1, pp. 27–34. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.007.
- OSORIO-CADAVID, E., CHAVES-LÓPEZ, C., TOFALO, R., PAPARELLA, A. y SUZZI, G., 2008. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology*, vol. 25, no. 6, pp. 771–777. DOI 10.1016/j.fm.2008.04.014.
- OUGH, C.S., 1966a. Fermentation Rates of Grape Juice. II Effect of Initial °Brix, pH, and Fermentation Temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 17, no. 1, pp. 20–26.
- OUGH, C.S., 1966b. Fermentation Rates of Grape Juice. II Effect of Initial °Brix, pH, and Fermentation Temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 17, no. 1, pp. 20–26.
- PEREIRA, A.P., MENDES-FERREIRA, A., OLIVEIRA, J.M., ESTEVINHO, L.M. y MENDES-FAIA, A., 2013. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology*, vol. 33, no. 1, pp. 114–123. DOI 10.1016/j.fm.2012.09.006.
- PÉREZ-NEVADO, F., ALBERGARIA, H., HOGG, T. y GIRIO, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 108, no. 3, pp. 336–345. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012.
- POSTE, L.M., MACKIE, D.A., BUTLER, G. y LARMOND, E., 1991. *Laboratory Methods for Sensory Analysis of Food*. S.I.: Research Branch, Agriculture Canada.
- QUEROL, A. y FLEET, G.H., 2006. *Yeasts in Food and Beverages*. S.I.: Springer. ISBN 9783540283881.
- RENAULT, P.E., ALBERTIN, W. y BELY, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 9, pp. 4105–4119. DOI 10.1007/s00253-012-4660-5.
- RUSSO, P., CAPOZZI, V., SPANO, G., CORBO, M.R., SINIGAGLIA, M. y BEVILACQUA, A., 2016. Metabolites of Microbial Origin with an Impact on Health: Ochratoxin A and Biogenic Amines. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. 199, pp. 482. DOI 10.3389/fmicb.2016.00482.
- SAERENS, S.M.G., DELVAUX, F., VERSTREPEN, K.J., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J.M. y DELVAUX, F.R., 2008. Parameters Affecting Ethyl Ester

- Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, no. 2, pp. 454–461. DOI 10.1128/AEM.01616-07.
- SAERENS, S.M.G., DELVAUX, F.R., VERSTREPEN, K.J. y THEVELEIN, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial biotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 165–177. DOI 10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x.
- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL, 1972a. *Norma Mexicana NMX-V-040-1972 Método de prueba para la determinación de azúcar, previa inmersión en pulque*. 13 abril 1972a. S.l.: s.n.
- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL, 1972b. *Norma Mexicana NMX-V-041-1972 Método de prueba para la determinación de pH en pulque*. 13 abril 1972b. S.l.: s.n.
- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL, 1972c. *Norma Mexicana NMX-V-042-1972 Método de prueba para la determinación de acidez total en pulque*. 13 abril 1972c. S.l.: s.n.
- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL, 1972d. *Norma Mexicana NMX-V-045-1972 Método de prueba para la determinación del índice de refracción con el refractómetro de inmersión*. 13 abril 1972d. S.l.: s.n.
- SECRETARÍA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL, 1972e. *NORMA MEXICANA «PULQUE MANEJADO A GRANEL»*. NMX-V-037-1972. 13 abril 1972e. S.l.: s.n.
- SECRETARÍA DE ECONOMÍA, 2016. *Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015, Bebidas Alcohólicas-Denominación, Especificaciones Físicoquímicas, Información Comercial Y Métodos de Prueba*. 29 febrero 2016. S.l.: s.n.
- STALLER, J., 2009. *Maize Cobs and Cultures: History of Zea mays L.* S.l.: Springer Science & Business Media. ISBN 9783642045066.
- STEINKRAUS, K., 2004. *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. S.l.: CRC Press. ISBN 978-0-8247-4784-8.
- STEVENSON, D.E. y HURST, R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 64, no. 22, pp. 2900–2916. DOI 10.1007/s00018-007-7237-1.
- STONE, H., BLEIBAUM, R. y THOMAS, H., 2012a. *Chapter 1. Introduction to Sensory Evaluation*. Fourth Edition. S.l.: Elsevier Inc. ISBN 9780123820860.

- STONE, H., BLEIBAUM, R. y THOMAS, H., 2012b. *Chapter 7. Affective Testing*. Fourth Edition. S.I.: Elsevier Inc.
- TAILLANDIER, P., LAI, Q.P., JULIEN-ORTIZ, A. y BRANDAM, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, no. 7, pp. 1959–1967. DOI 10.1007/s11274-014-1618-z.
- ULLOA, M., HERRERA, T. y LAPPE, P., 1987. *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. S.I.: Instituto Nacional Indigenista.
- ULLOA, M., SALINAS, C. y HERRERA, T., 1974. Study of *Bacillus megaterium* isolated from «tesgüino» (an alcoholic beverage) of Chihuahua, Mexico. *Revista latinoamericana de microbiología*, vol. 16, no. 4, pp. 209–211.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, 2012. Gran Diccionario náhuatl [en línea]. *Gran Diccionario Náhuatl* [en línea]. [Consulta: 8 noviembre 2017]. Disponible en:
<http://www.gdn.unam.mx/termino/search?queryCriterio=tecuini&modulo=termino&action=search&queryEnDiccionarios%5B%5D=0&queryPartePalabra=inicio&queryBuscarEn=nahuatlGrafiaNormalizada&queryLimiteRegistros=200>.
- VALDÉS, J.M., 2012. Desarrollo de una tecnología para elaborar vino blanco común con vitis no vinífera cultivada en Misiones, Argentina,
- WANG, C., MAS, A. y ESTEVE-ZARZOSO, B., 2015. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 206, pp. 1–39. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.022.
- WANG, S., INGLEDEW, W.M., THOMAS, K.C., SOSULSKI, K. y SOSULSKI, F.W., 1999. Optimization of Fermentation Temperature and Mash Specific Gravity for Fuel Alcohol Production. *Cereal Chemistry Journal*, vol. 76, no. 1, pp. 82–86. DOI 10.1094/cchem.1999.76.1.82.
- WARRICK, S., 2010. *The Way to Make Wine*. S.I.: Univ of California Press. ISBN 0520946340.
- ZAVALETA MERCADO, R., 2011. Preparación de jarabes de sacarosa mediante mediciones volumétricas. *Acta Nova*, vol. 5, no. 1, pp. 110–137.
- ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L. y MILLER, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, vol. 7, no. 1-2, pp. 203–214. DOI 10.1089/10665270050081478.

8. APÉNDICE

8.1 ANEXO A. ALINEACIÓN DE SECUENCIA GENÉTICA DE CEPA UTILIZADA

Saccharomyces cerevisiae YJM456 chromosome XII sequence

Sequence ID: CP006448.1 Length: 1606260 Number of Matches: 63

Range 1: 438932 to 439790 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1373 bits(743)	0.0	824/863 (95%)	6/863 (0%)	Plus/Minus

```

Query 9      CGTAGGTG-ACCTGCGG-AGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGAttttt 66
          |||
Sbjct 439790 CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAAATGGATTTTT 439731

Query 67     ttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA 126
          |||
Sbjct 439730 TTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTACTGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCA 439671

Query 127    GCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGCTTGCTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTGCTATTC 186
          |||
Sbjct 439670 GCCGGCCTGCGCTTAAGTGC GCGGCTTGCTAGGCTTGTAAAGTTCTTTCTTGCTATTC 439611

Query 187    CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACAAC 246
          |||
Sbjct 439610 CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATAAAACCGTTTCAATACAAC 439551

Query 247    AACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC 306
          |||
Sbjct 439550 AACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTTCGAGCAATCGGGGCC 439491

Query 307    CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT 366
          |||
Sbjct 439490 CAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTTGTCAAAAACAAGAAT 439431
    
```

