

15
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE ALGUNOS PARAMETROS EN LA PRODUCCION CASERA DE TIBICOS Y SU RELACION A LA MICROBIOTA Y PRODUCTOS DE FERMENTACION

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
CAROLINA ARMIJO DE VEGA

MEXICO, D. F.

PALA DE ORIGEN

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

	Pág
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1. Factores que afectan el crecimiento de micro- organismos.....	12
3.1.1 Aireación.....	12
3.1.2 Efecto del pH.....	13
3.1.3 Tipo de Sustrato.....	15
3.1.4 Temperatura.....	16
3.2 Fementación.....	16
3.2.1 Definición de Fermentación.....	17
3.2.2 Factores y Leyes de la Fermentación....	18
3.2.3 Sustratos azucarados (piloncillo,- melaza y sacarosa).....	19
3.3 Los Tibicos.....	20
3.3.1 Definición.....	20
3.3.2 Trabajos Realizados.....	21
4 MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1 Efecto del pH inicial en Cultivos de Tibicos....	24
4.2 Efectos de la Aireación en Cultivos de Tibicos..	26
4.3 Efectos del tipo de sustrato en la concen- tración de etanol y ácido acético producidos- en cultivos de tibicos.....	27
4.4 Aislamiento y determinación de las especies de le- vaduras encontrados en los tibicos y en los sustratos fermen- tados	28
4.5 Efecto de dos sustratos estériles y no- estériles en el cultivo de tibicos.....	31

	Pág.
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
5.1 Efecto del pH inicial.....	33
5.2 Efecto de la aireación.....	34
5.3 Efecto del tipo de sustrato en la concentración de etanol y ácido acético.....	35
5.4 Levaduras encontradas en los tibicos y en los sustratos fermentados estudiados.....	36
5.5 Efecto de dos sustratos estériles y no estériles en el cultivo de tibicos.....	37
6. CONCLUSIONES.....	51
APENDICE. Análisis estadístico.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	77

1. RESUMEN

El problema alimentario en México no es nuevo y se incrementa conforme la población crece. Una posible solución a este problema se plantea a través del cultivo de microorganismos, en particular de los tибicos, que son microbiogleas constituidas por una matriz de dextranas en la que se encuentran embebidas bacterias y levaduras.

El presente trabajo tuvo como objetivos determinar algunos de los parámetros óptimos del crecimiento de dichas microbiogleas y así obtener un mejor aprovechamiento de los tибicos en beneficio del hombre. Tales objetivos fueron:

-Determinar el efecto del pH inicial y de la aireación de los cultivos de tибicos sobre la cantidad de biomasa producida y la concentración de los productos de fermentación (etanol y ácido acético).

-Determinar el efecto de tres sustratos diferentes (piloncillo, melaza y sacarosa) en los cultivos, en relación a la concentración de etanol y ácido acético.

-Aislar y determinar las especies de levaduras que constituyen las microbiogleas en cultivos con dos diferentes sustratos.

-Determinar el efecto de la esterilidad de dos sustratos diferentes (piloncillo y melaza) sobre el desarrollo de los cultivos de tибicos.

El control del pH inicial no tuvo ningún efecto sobre la producción de biomasa. Las concentraciones de etanol y ácido

acético se vieron poco afectadas con el uso de una de las soluciones amortiguadoras.

La aireación no tuvo ningún efecto sobre los parámetros estudiados.

La melaza fue el sustrato con el que hubo una mayor producción de etanol y ácido acético, seguida de el piloncillo.

Se identificaron dos especies de levaduras que no habían sido registradas en tибicos; *Candida valida* (Leberie) y *Candida famata* (Harrison) Meyer et Yarrow, aunque habían sido encontradas anteriormente en otros alimentos fermentados.

El tipo de sustrato utilizado, sin importar su esterilidad, determinó la forma en que los cultivos de tибicos se desarrollaron. La melaza favoreció el crecimiento de una película pulverulenta en la superficie del cultivo constituida principalmente por pseudomicelio de *Candida valida*. El piloncillo favoreció la formación de una nata blanca en la superficie del cultivo, constituida por una matriz en la que se encontraban embebidas bacterias y levaduras y que se parece a la madre del vinagre.

2. INTRODUCCION

México, como el resto de los países subdesarrollados, cuenta con un grave problema, el alimentario. Existen evidencias de que la alimentación en México antes de la conquista era muy variada; la base de la alimentación fué el maíz pero también existían otras fuentes de proteínas de origen vegetal, como las siguientes: la setaria (gramínea que ha sido considerada como el primer cereal del Nuevo Mundo), el nopal, el maguey (del cual consumían tanto las hojas como la savia), el frijol, las calabazas, los chiles, los tomates, aguacates, huauzontles, quelites y quintoniles, el cacao y varios frutos. Las fuentes de proteína de origen animal más comunes eran los guajolotes y los perros, aunque también se consumían otros animales como tlacoaches, armadillos, conejos, ardillas, tuzas, zorrillos, todo tipo de aves y animales acuáticos como renacuajos, acociles y peces, además de una gran variedad de variedad de insectos y sus huevecillos (Casillas y Vargas, 1984).

Como se puede ver, los antiguos mexicanos consumían una gran variedad de alimentos, pero estos no eran accesibles a toda la población puesto que intervenía otro factor, la clase social. Por lo tanto, también entonces había desnutrición y muerte de gran parte de la población por falta de alimentos, hechos que han sido constatados por

estudios osteológicos de restos humanos de aquella época (Vargas, 1985).

Después de la conquista las epidemias no fueron la única causa de una alta mortandad. Hubo grandes episodios de hambre que fueron causados por sequías, invasiones de langostas, fuertes lluvias, granizo, los altos precios del maíz y otros factores. El suministro de alimentos cambió, los españoles trajeron nuevas plantas y animales a México que tuvieron que competir en tierra y fuerza de trabajo con los alimentos nativos.

En la actualidad, la crisis económica ha afectado la alimentación de la población y su forma de vida. Existe una polarización de alimentos mediante la cual cierto tipo de éstos son enviados a partes específicas del país en donde tienen gran aceptación; estas partes son las grandes ciudades o pueblos. Esto hace que los pequeños poblados sean dependientes de sus propios recursos. Existe también una transnacionalización de alimentos, es decir, la manera en que los alimentos "internacionales" son promovidos por los medios de comunicación, de manera que éstos se convierten en una necesidad para la sociedad. Estos alimentos incluyen la llamada "comida chatarra", panes industrializados, pastelillos, saborizantes, gelatinas, cerveza, vino, etc., la mayoría de los cuales proporcionan un contenido muy bajo de nutrimentos por un precio muy elevado (Vargas, 1985).

Estas tendencias están bien establecidas y son las responsables de la división tan marcada de la alimentación en México. Esto hace que algunas personas estén sobrealimentadas y presenten problemas de obesidad por el consumo extra de calorías, otras tienen una nutrición insuficiente y presentan malnutrición crónica; por otra parte, también existen casos de muerte por falta de alimentos.

Se sabe que el problema de la alimentación es sumamente extenso y complejo, ya que en forma directa o indirecta los comprende a todos: transporte, producción agrícola, pesca, política aduanera, monopolios, etc. Pero es más importante la educación e instrucción de la población, para que sus integrantes aprendan a sacar de sus reducidos salarios el mayor provecho posible y se proporcionen los alimentos indispensables de sostenimiento.

En todos los países subdesarrollados más del 50% de la población total vive en la pobreza, con el hambre como compañera constante. En estos países un vasto segmento de sus habitantes generalmente practica la agricultura a niveles de subsistencia en minifundios y para ellos los alimentos y especialmente las proteínas de origen animal son escasos y caros (Borlaug, 1974).

En el siglo XX, como al principio de la historia humana, persiste el hambre como uno de los más antiguos problemas que han existido. Sólo se eliminará cuando

la aplicación de los conocimientos y la destreza de la ciencia moderna proporcionen a todos la cantidad y la calidad de alimento que necesitan.

En la lista de principios nutritivos esenciales figuran el oxígeno y el agua, que generalmente no se consideran alimentos. Existen otros 43 principios nutritivos que por comodidad se clasifican dentro de los cinco grupos principales; carbohidratos, grasas, proteínas, minerales y vitaminas. Los azúcares y almidones (carbohidratos) son la fuente, directamente o por conversión química en el cuerpo, de un solo principio nutritivo esencial, la glucosa. Los requerimientos de estos elementos nutritivos varían de acuerdo con la edad, el sexo, el estado fisiológico, el grado de actividad y el clima.

Estos principios esenciales forman la dieta que mantiene a los seres humanos sanos. Todos ellos abundan en los productos alimenticios que pueden encontrarse de un extremo a otro de nuestro planeta. A pesar de ello, no hay una sola parte en el mundo en la que todos obtengan las cantidades adecuadas de alimentos apropiados.

Los cereales son la fuente principal de carbohidratos, los lípidos se obtienen de las grasas vegetales o animales, las vitaminas y las sales minerales se encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal y también se pueden producir de forma sintética. Las proteínas tienen

un alto valor nutricional y están directamente relacionadas con los procesos químicos necesarios para mantener la vida. El hombre obtiene proteínas principalmente de la carne de ganado de aves y peces así como de la leche y sus productos derivados. Las semillas de leguminosas, en especial la soya, están siendo usadas para preparar alimentos ricos en proteínas a un bajo costo. La cantidad diaria de proteínas que se necesitan para mantener los músculos, órganos internos y otros tejidos del cuerpo, es muy pequeña. Durante el crecimiento también se requieren proteínas para la formación de músculos y otras partes del cuerpo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda las siguientes cantidades diarias de nutrimentos por persona, dependiendo de la edad, talla y peso del individuo, como se indica a continuación (Ramos Galván, 1980).

Edad	Peso kg	Talla cm	kcal	Proteínas (g)
0-	0.5	6	kg x 115	kg x 2.2
Lactantes				
		60		
Niños				
1-	3.9	13	1,300	23
4-	6.9	20	1,700	30
7-	10.9	28	2,400	34
Hombres				
11-	14.9	45	2,700	45
15-	18.9	66	2,800	56
19-	22.9	70	2,900	56
23-	50.9	70	2,700	56
51-	75.9	70	2,400	56
Mujeres				
11-	14.9	46	2,200	46
15-	18.9	55	2,100	46
19-	22.9	55	2,100	44
23-	50.9	55	2,000	44
51-	75.9	55	2,000	44

El Instituto Nacional de Nutrición (INN) recomienda la ingestión de 2,750 kcal y 80 gramos de proteínas por persona al día (Secretaría de Programación y Presupuesto, 1982). Serrano L. (1986) estimó el déficit proteico en México:

AÑO	POBLACION	PRODUCCION NECESARIA DE PROTEINAS (TON)	DEFICIT PROTEICO RESPECTO A 1982
1988	84,703,224	2,315,437	22.0 %
1990	88,237,605	2,576,538	34.4 %
2000	100,000,000	2,920,000	42.1 %

Partiendo de estos datos es evidente, como ya se mencionó, que el problema alimentario va en aumento y que urge resolverlo.

En los países subdesarrollados gran proporción de la proteína consumida es de origen vegetal. Se sabe que todas las proteínas de origen vegetal son deficientes en uno o más de los aminoácidos esenciales. La principal fuente de proteínas de origen animal la constituyen la carne, las aves, los lácteos, los huevos y los peces. Desafortunadamente existe una gran disparidad en la distribución de las bien balanceadas proteínas de origen animal (Borlaug, 1974).

El frijol, el maíz, la papa, el haba, el chile, etc., son unos de los alimentos que con más frecuencia se consumen en nuestro país y no siempre van acompañados de carne o huevo, por lo que el contenido proteico de la dieta del mexicano es muy bajo; por ejemplo, 300 g de papas

tienen 6 g de proteínas, 400 g de tortillas cuentan con 34 g de proteínas (Ventosa, 1947).

En el año 2000 México tendrá algo más de 100 millones de habitantes y un déficit proteico en la dieta de alrededor del 42.1% (Escudero, *et. al.*, 1984). Una posible solución que puede instrumentarse a nivel casero es la producción de proteínas a través del cultivo de microorganismos, ya sea para el consumo humano directo, o para la alimentación de animales domésticos relacionados con la llamada ganadería de traspatio (Díaz-Garcés, *et al.*, 1988). Desde este punto de vista, el cultivo de tибicos ofrece grandes posibilidades porque dichas microbiotas constituyen un sistema biológico muy estable con el que se pueden obtener cantidades considerables de biomasa de manera fácil, barata y rápida.

Al respecto, Taboada *et al.* (1987) realizaron un estudio de las levaduras de los tибicos y con ellos alimentaron aves y roedores con el objeto de ver si el conjunto de estas asociaciones microbianas eran aceptadas como alimento y si ocasionaban lesiones en órganos internos, así como para saber si los tибicos eran un buen complemento en la dieta de los animales.

Los resultados mostraron que con ninguna de las proporciones de tибicos utilizadas en las dietas de todos los animales de experimentación se encontraron lesiones

histológicas específicas en riñón, hígado, corazón y pulmón; la degeneración grasa del hígado observada en pollos de engorda, gallinas ponedoras y ratas se presentó con mayor frecuencia en los animales que ingirieron dietas con más del 50% de tībicos, de manera que, aun cuando estas microbiogreas no pueden ser recomendadas como un complemento dietético cuando se emplean en proporciones elevadas, junto con el alimento balanceado que rutinariamente se utiliza, el hecho de que no representen un peligro para la salud de los consumidores y de que su cultivo se puede realizar con relativa facilidad y economía los hacen una fuente de alimento muy atractiva.

Serrano (1986) y Díaz-Garcés *et al.* (1988) determinaron algunas de las condiciones del cultivo de tībicos para obtener el mayor rendimiento de biomasa en relación con el tipo y cantidad de sustrato, temperatura y tiempo de incubación. Cuando los cultivos de tībicos se mantuvieron a temperatura ambiente, los mayores rendimientos de biomasa se alcanzaron con 45 y 50 g de pīoncillo a las 96 horas, y con 50 y 55 g de melaza a las 48 y 72 horas.

Siguiendo con este esquema de trabajo, se decidió experimentar con los parámetros que aun no habían sido estudiados, siendo los objetivos del presente trabajo los siguientes:

a) Determinar el efecto del pH inicial y de la alreación

del cultivo de tибicos sobre la cantidad de biomasa producida y la concentración de los productos de fermentación (etanol y ácido acético).

- b) Determinar el efecto de tres sustratos diferentes (piloncillo, melaza y sacarosa) empleados en cultivos de tибicos en relación a la concentración de etanol y ácido acético.
- c) Aislar determinar las especies de levaduras presentes en las microbiogleas y en los diferentes sustratos fermentados.
- d) Determinar de qué manera los diferentes sustratos utilizados afectan la forma en que se desarrollan los cultivos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Factores que afectan el crecimiento de microorganismos.

Los principales factores ambientales que influyen en el crecimiento de microorganismos son la aireación, el pH, el tipo de sustrato (alimento), la temperatura, la humedad y el tipo y concentración de sustancias inhibitorias. Cada uno de estos factores es importante, pero es la combinación de todos ellos la que determina qué tipo de microorganismos crecerán y que tan rápidamente lo harán, así como qué cambios se producirán y a qué velocidad (Frazier, 1958).

3.1.1. Aireación.

Basándose en los procesos de respiración, los microorganismos pueden clasificarse como aerobios si requieren oxígeno para su crecimiento. Los microorganismos de este tipo sólo crecen en la superficie de los medios de cultivo. Los anaerobios no requieren oxígeno y crecen mejor en su ausencia, y los facultativos si pueden crecer con o sin oxígeno. Las bacterias microaerofílicas requieren de una pequeña cantidad de oxígeno libre (Frazier, 1958; Lehninger, 1983).

Hawker y Linton (1979) recomiendan una aireación

constante e intensa para acelerar el crecimiento y producción de levaduras. La secuencia normal de eventos en una fermentación alcohólica es una multiplicación rápida de las células de levaduras con un consecuente agotamiento de oxígeno, lo que detiene la multiplicación celular y las levaduras pasan a su fase anaerobia para obtener energía, con la consecuente producción de etanol y dióxido de carbono. Si se mantienen las células en su fase aerobia se producirá un máximo de biomasa con una mínima producción de alcohol.

Potter (1973) dice al respecto: la cantidad de oxígeno que requiere un organismo para el crecimiento, es decir, la multiplicación de sus células, puede diferir de la que necesita para la actividad fermentativa. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* crece mejor y produce una mayor masa de células bajo condiciones aerobias, pero fermenta azúcares más rápidamente bajo condiciones anaerobias.

Carbajal de Echevarri (1986) dice que el oxígeno libre no es esencial para las levaduras, pero en presencia de alimento abundante actúa como un estimulante del desarrollo celular. En escala comercial se logra el crecimiento celular sin fermentación, empleando mostos muy diluidos y excesivamente aireados.

3.1.2. Efecto del pH.

La concentración del ión hidrógeno determina el tipo

de microorganismos que crecerán. Cada organismo tiene su valor óptimo de pH. La mayoría de las bacterias crece mejor en un pH cercano al neutro, pero algunas están favorecidas por una reacción ácida, y algunos tipos pueden crecer en medios poco ácidos o alcalinos (Frazier, 1958).

En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el control del pH es importante cuando se quiere obtener un mayor rendimiento de biomasa. Existen muchas maneras en las que la concentración del ión hidrógeno ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$) del medio puede afectar a los microorganismos. El efecto neto del pH actuando en estos términos es expresado por el crecimiento resultante y la reproducción de los microorganismos. El estado nutricional del medio está fuertemente afectado por el pH pues altera la absorción y solubilidad de los iones y la disociación de las moléculas determinando así su disponibilidad a los microorganismos y la forma apropiada para realizar el transporte a través de la membrana celular (Rose, 1982).

Los microorganismos crecen dentro de límites de pH, que usualmente tienen un nivel mínimo y óptimo bien definido. El pH mínimo para el crecimiento es generalmente cercano a 2.5, y un máximo que va de 8 a 9; el óptimo varía ampliamente y frecuentemente se encuentra entre el pH 5 y el pH 7.5 (Hawcker y Linton, 1979).

Al respecto, Carbajal de Echevarri (1986) dice que está

perfectamente reconocido que la influencia de la concentración de iones hidrógeno en la fermentación es fundamental para lograr un buen éxito en la calidad y en la cantidad de levaduras. Existe un valor de pH para el cual las levaduras crecen mejor, habiendo cierta concentración de iones H^+ arriba de la cual el crecimiento es nulo. También tienen un límite mínimo. Las levaduras tienen la propiedad de adaptarse a distintos valores de pH.

Las células vivientes están bien amortiguadas internamente contra los cambios de pH; los valores de pH del medio deben de ser extremos antes de que el pH intracelular sea afectado. Las enzimas extracelulares tienen influencia directa sobre el pH del medio (Rose, 1982).

3.1.3. Tipo de sustrato.

El tipo de sustrato en el cual se desarrollan los microorganismos es muy importante pues va a determinar los nutrimentos de que pueden disponer las células vivas.

Cada tipo de microorganismo tiene un tipo definido de requerimientos alimenticios. Para algunas especies éste es muy amplio, y el crecimiento se da en una gran variedad de sustratos; sin embargo, otras tienen un tipo muy reducido. Muchos microorganismos difieren en el tipo de alimentos que pueden utilizar para obtener energía; algunos pueden utilizar varios carbohidratos, otros

solamente utilizan uno o dos, mientras que otros pueden emplear varios compuestos de carbono como ácidos orgánicos y sus sales, alcoholes y ésteres. Los requerimientos de nitrógeno de algunas especies pueden satisfacerse con compuestos simples tales como amonio, nitratos o compuestos más complejos como aminoácidos, péptidos o proteínas (Frazier, 1958).

3.1.4. Temperatura.

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima bajo la cual crece mejor, una temperatura mínima que es la más baja que puede tolerar y en la que el crecimiento se puede dar, y una temperatura máxima que es la más alta en la que las células se pueden dividir.

3.2. Fermentación.

Las células microbianas, como cualquier otra célula, deben ser capaces de realizar funciones si se mantienen vivas y en crecimiento. Por ejemplo, deben ser capaces de sintetizar los constituyentes del complejo celular a partir de los nutrimentos del medio, de llevar tales procesos a la división celular, y de efectuar los movimientos de las células. Para realizar tales funciones la célula debe tener una fuente de energía. Los carbohidratos representan una fuente potencial de energía, puesto que son compuestos en los que ella está almacenada. Los

microorganismos obtienen la energía necesaria por medio de los procesos de oxidación y reducción de los carbohidratos.

3.2.1. Definición de fermentación.

La fermentación se define como la degradación anaeróbica de la glucosa, la oxidación de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular es llamada respiración (Lehninger, 1983).

Los combustibles más comunes para la fermentación son los azúcares, particularmente la D-glucosa, sin embargo algunos microorganismos pueden obtener su energía metabólica efectuando la fermentación anaeróbica de moléculas tales como los ácidos grasos, los aminoácidos, las purinas o las pirimidinas, según las especies.

Entre las muchas clases de fermentación de la glucosa, predominan dos tipos íntimamente relacionados. En la fermentación homoláctica, la molécula de glucosa de seis átomos de carbono se degrada y forma dos moléculas de ácido láctico como producto final. Este tipo de escisión de la glucosa la realizan muchos microorganismos. En la fermentación alcohólica, característica de muchas levaduras, la molécula de la glucosa se escinde y rinde dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono. La fermentación alcohólica se produce por las mismas transformaciones enzimáticas que la fermentación

fermentación homoláctica, pero precisa de dos etapas enzimáticas diferentes al final de la ruta. La mayor parte de los demás tipos de fermentación de la glucosa son variaciones de la ruta fundamental de la fermentación homoláctica (Lehninger, 1983).

Los microorganismos en las fermentaciones siguen un orden de ataque a los nutrimentos, lo que se da de la siguiente manera: primero los hidratos de carbono, después las proteínas y por último las grasas. Dentro de los carbohidratos, también se tiene un orden de ataque: primero los azúcares, luego los alcoholes y por último los ácidos. Los azúcares pueden ser fermentados por los distintos microorganismos en diversas formas: por oxidación completa, por oxidación parcial, por fermentación alcohólica, por fermentación láctica, por fermentación butírica y por otras acciones fermentadoras menores (Medina, 1985).

3.2.2. Factores y leyes para la fermentación.

La fermentación:

- es proporcional a la cantidad presente de organismos fermentadores
- es proporcional a la cantidad de sustrato
- se favorece por la temperatura óptima
- requiere de un valor determinado de pH para cada caso
- está influida por sustancias inorgánicas

- está influida por productos de la misma reacción
- existe un sistema regulador de ésta en el interior de los organismos (Giral, 1940).

3.2.3. Sustratos azucarados (piloncillo, melaza y sacarosa).

Existen muchos sustratos susceptibles de ser fermentados como lo son las cáscaras de frutas, el piloncillo y la melaza, entre otros.

La melaza es un derivado importante de la industria de la caña de azúcar (Clive y Thomas, 1987). Se puede definir como el producto final obtenido en la preparación del azúcar por cristalización repetida. Es la miel residual de la cual no se puede obtener sacarosa cristalina por medios simples (Paturav, 1982).

De acuerdo a el origen de la melaza existen diferencias en la composición de ésta, pero en promedio, la composición es la siguiente: azúcares reductores 50-65 %, nitrógeno total 0.4-1.5%, α -Amino nitrógeno 0.05 %, fósforo 0.2 - 2.0 %, calcio 0.1 - 1.3 %, magnesio 0.3 - 1.0 %, potasio 2.6 - 5.0 %, zinc 10 - 20 $\mu\text{g/g}$, cenizas 7 - 11 %, biotina 0.6 - 3.2 $\mu\text{g/g}$, pantotenato de calcio 20 - 120 $\mu\text{g/g}$, inositol 6000 $\mu\text{g/g}$, tiamina 1.4 - 8.3 $\mu\text{g/g}$, piridoxina 6 - 7 $\mu\text{g/g}$, riboflavina 2.5 $\mu\text{g/g}$, nicotinamida 20 - 25 $\mu\text{g/g}$, ácido fólico 0.04 $\mu\text{g/g}$ (Burrows, 1970).

El piloncillo también es un derivado del jugo de la caña de azúcar, pero su proceso de obtención es diferente.

Por cada 100 g de piloncillo se obtienen 356 kcal, 0.4 g de proteínas, 0.5 g de grasas, 90.6 g de carbohidratos, 51 mg de calcio, 4.2 mg de hierro, 0.02 mg de tiamina, 0.11 mg de riboflavina, 0.3 mg de niacina y 2 mg de ácido ascórbico (Hernández, 1983).

La sacarosa es un solo azúcar y su composición es la siguiente: por cada 100 g de azúcar se tienen 384 Kcal, 0.00 proteínas 0.0 grasas, 99.1g de carbohidratos, 0.0 vitaminas (Heranández, 1983).

3.3. LOS TIBICOS.

3.3.1. Definición.

A través de las diferentes culturas prohispanicas, los mexicanos han recurrido al uso de diferentes alimentos y bebidas fermentados por bacterias y levaduras, entre los que se puede mencionar el pulque, el pozol, el tesgüino, la tuba, el colonche y el tepache, este último ocasionalmente elaborado con tibicos. Algunos de estos productos han sido ampliamente estudiados como es el caso del pulque (Ulloa, *et al.* 1987).

Los tibicos son microbriotas o masas gelatinosas compactas, de color blanquecino o amarillento, translúcidas u opalescentes, atravesadas irregularmente por vetas muy finas, de forma irregular y de tamaño variable, miden desde unos pocos milímetros hasta uno o dos centímetros que se desarrollan en artículos y frutos de nopales

(*Opuntia* spp.), en jugos de frutas como la piña y en aguas endulzadas con piloncillo o azúcar morena (Ulloa y Herrera, 1981).

3.3.2. Trabajos realizados.

El estudio de los tибicos en México comenzó a finales del siglo pasado con Lutz (Lutz, 1899), quien realizó un trabajo microbiológico de las microbiogleas que denominó "tibi". De los tибicos aisló una bacteria y una levadura que respectivamente denominó *Bacillus mexicanus* y *Saccharomyces radaisii*.

En 1932 Ruiz Oronoz continuó el estudio respecto a la parte micológica. Como resultado de este estudio describió las características morfológicas y fisiológicas de las especie que nombró *Pichia radaisii* (Lutz) Ruiz Oronoz.

También en 1932, Moreno y Díaz realizó un estudio químico y microbiológico del vinagre producido por tибicos. Aisló y describió cinco bacterias: *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers, *Proteus vulgaris* Hauser, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Bacillus graveolans* Meyer et Gottheil, *Acetobacter peroxidans* Visser't Hooft y una levadura, *Saccharomyces ellipsoideus* Meyen ex Hansen.

En 1952, Mascott y Terrés también estudió las levaduras

de los tísticos. Aisló y describió dos especies: *Saccharomyces oviformis* Osterwalder y *Pichia chodatii* (Zender) Dekker var. *trumpyi* (Zender et Bevan) Dekker. Además reportó haber encontrado varias formas de *Corynebacterium*.

En 1965 Hesseltine reportó la bacteria encapsulada *Betabacterium vermiforme* (Ward) Mayer, y la levadura *Saccharomyces intermedius* Hansen, en los granos del tístico.

En 1981 Ulloa y Herrera aislaron de los tísticos a las levaduras *Pichia membranaefaciens* Hansen y *Saccharomyces cerevisiae*.

En 1984 Herrera et al. publicaron un estudio sobre bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de los tísticos. Dichas bacterias fueron identificadas como *Klebsiella oxytoca* (Flügge) Lautrop.

Estrada-Cuellar en 1985, realizó un estudio de las levaduras que forman parte de la asociación microbiana de los tísticos, y aisló y describió dos especies: *Brettanomyces intermedius* (Krumbholz et Tauschanoff) van der Walt et van Kerken y *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen.

Todos estos han sido estudios microbianos de los tísticos aunque también se han realizado algunos estudios para dilucidar la naturaleza química de la matriz en la que están embebidas las levaduras y bacterias que constituyen dicha asociación. Al respecto, en 1969

Horisberger estudió la estructura de la matriz de los tíficos y encontró que se trataba de dextranas, polisacáridos en los que se encuentran embebidas las especies de bacterias identificadas como *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al. y *Streptococcus lactis* (Lister) Löhnis, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En 1980 Molinas et al. estudiaron la estructura de los granos de tíficos. Encontraron que están constituidos de una capa externa compacta y de una estructura interna esponjosa. La capa externa está densamente poblada por lactobacilos, estreptococos y levaduras embebidos en la dextrana descrita por Horisberger y que es generada por *Lactobacillus brevis*.

Al igual que Horisberger, Pidoux et al. (1988) encontraron que *Lactobacillus brevis* es la bacteria que produce los mismos polisacáridos que los que se encuentran en los granos del kefir, los cuales son microbiogleas o asociaciones de levaduras y bacterias similares a los granos de tífico, pero de origen diferente y que se utilizan para fermentar leche.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Efecto del pH inicial en cultivos de tибicos.

Para encontrar cuál es el efecto de la variación del pH inicial en cultivos de tибicos, se trabajó con tres lotes experimentales y un lote control, cada uno de los cuales tuvo cuatro repeticiones. Cada repetición es un cultivo experimental montado de acuerdo a las condiciones óptimas encontradas por Serrano (1985) en cuanto a tipo y cantidad de sustrato, volumen de agua y cantidad inicial de tибicos para ser cultivados a temperatura ambiente. Estas condiciones son (para 50 ml de agua) 27.5 g de piloncillo y 12.5 g de tибicos hidratados puestos en frascos de vidrio de 100 ml y tapados con manta de cielo.

A los tres lotes experimentales se les controló el pH inicial adicionándoles en lugar de agua una solución amortiguadora.

Dentro de los límites de pH (0 - 14) se escogieron tres valores: 3, 5.5 y 8, uno para cada uno de los lotes experimentales. Se procedió a preparar las soluciones que amortiguaran en los límites mencionados, lo que se hizo de acuerdo a las fórmulas propuestas por Dawson *et al.*, 1969. La solución que regula los valores de pH cercanos a 3 fue preparada con 0.056 ml de ácido clorhídrico y 0.188 g de glicina, aforados a 200 ml con agua destilada; la que regula valores de pH cercanos a 5 fue preparada con 1.238 g de acetato de sodio trihidratado y 0.05 ml de ácido acético, aforados a 200 ml con agua destilada; la que regula valores

de pH cercanos a 8 fue preparada con 0.604 g de tris-aminometano y 0.235 ml de ácido clorhídrico, aforados a 200 ml con agua destilada. Para controlar el pH durante la preparación de estas soluciones se usó un potenciómetro Beckman 3500 digital.

En la preparación de los medios de cultivo se llevaron a cabo los siguientes pasos:

-se lavaron los frascos

-se pesaron en una balanza granataria Mettler P1210 las cantidades de piloncillo comercial y de túbicos necesarios para cada frasco

-se midió en una probeta el volumen de agua o solución amortiguadora para cada uno de los frascos (50 ml en cada uno)

-se disolvió el piloncillo en el agua o amortiguador y se agregaron los túbicos

-se marcaron los frascos registrando en la etiqueta el número de lote, el número de frasco y la fecha

-los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente

-a las 24, 48 y 72 horas de haber montado los cultivos se tomaron las lecturas del pH

-a las 72 horas se tomaron muestras del líquido sobrenadante de cada lote y se sometieron a análisis cromatográfico para conocer las concentraciones de etanol y ácido acético producidas hasta ese tiempo.

-el análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo

Perkin-Elmer Sigma 1-B, bajo las siguientes condiciones:

.Detector de ionización de flama

.Flujo de nitrógeno de 25 ml por min

.Columna de vidrio Parapack Q de 5' / 1.8'

.Temperatura del inyector y del detector de 150°C

.Temperatura de la columna de 160°C

-también a las 72 horas se drenó la biomasa por espacio de un minuto y se pesó en balanza granataria.

4.2. Efecto de la aireación en cultivos de tибicos.

Se experimentó con cinco lotes, a cuatro de los cuales se les suministraron volúmenes diferentes de aire durante el día (durante la noche se mantuvieron sin aireación pues la compresora funciona de las 8:00 a las 20 horas) y el quinto lote se mantuvo sin aireación.

Los volúmenes de aire suministrados para cada lote fueron los siguientes:

.Lote #1 = 17.84 cm³ por min

.Lote #2 = 72.10 cm³ por min

.Lote #3 = 107.90 cm³ por min

.Lote #4 = 157.06 cm³ por min

.Lote #5 = sin aireación* (control)

* Al decir "sin aireación" se entiende que no se le añadió más aire, y que el oxígeno que tiene es el disuelto de acuerdo a sus presiones parciales.

Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

-todos los medios de cultivo se montaron con las mismas condiciones: 50 ml de agua, 27.5 g de piconcillo y 12.5 g de táticos

-los frascos se cerraron con tapones horadados y por el orificio se introdujo una manguera de plástico con una punta de tubo de cristal con el fin de que el burbujeo fuese más fino

-a cada frasco se le suministró el volumen de aire (ya mencionado) por medio de la manguera de plástico conectada a una llave de distribución, a la que llega el aire proveniente de la compresora

-para medir los volúmenes de aire se usó un flujómetro construido con una pipeta de 10 ml

-cada lote tuvo cinco repeticiones

-a las 24, 48 y 72 horas de haber montado los cultivos se tomó lectura del pH de cada uno de los lotes

-a las 72 horas se tomó una muestra del líquido sobrenadante de cada lote y se sometió a un análisis cromatográfico bajo las condiciones ya mencionadas para conocer el contenido de etanol y ácido acético.

-se drenó la biomasa durante un minuto y se procedió a pesarla. Los resultados de biomasa producida se muestran en el cuadro 6.

4.3. Efecto del tipo de sustrato en la concentración de etanol y ácido acético producidos en cultivos de táticos.

Para saber cuál es el efecto que tiene el tipo de

sustrato sobre la producción de etanol y ácido acético, se trabajó con tres lotes de cultivos (cada uno con un sustrato diferente pero inoculados con la misma cantidad de tибicos); cada lote tuvo cuatro repeticiones. El lote # 1 se montó con las condiciones ya mencionadas en cuanto a cantidad de agua, pилoncillo y tибicos, al lote # 2 se le suministró como sustrato melaza (27.5 gly) al lote # 3 sacarosa (27.5 g).

-Se lavaron los frascos en los que se realizaron los cultivos

-se montaron los cultivos bajo las condiciones ya mencionadas

-se tomaron muestras del líquido sobrenadante de los tres lotes a las 72 horas de haber sido montados, y se sometieron a un análisis cromatográfico.

4.4. Aislamiento y determinación de las especies de levaduras encontradas en los tибicos y en los sustratos fermentados.

Las levaduras encontradas en el presente estudio se aislaron de muestras de tибicos de origen inicial desconocido, los cuales fueron propagados en el Instituto de Química de la UNAM.

Antes de iniciar este trabajo, los tибicos fueron cultivados en agua con pилoncillo. La biomasa se lavó con agua corriente y se dividió en dos partes iguales, con las que se montaron dos cultivos; uno teniendo como sustrato pилoncillo y el otro melaza. A ambos se les cambió tanto el

agua como el sustrato cada 72 horas. Debido a condiciones ajenas a este trabajo, se dejó de cambiar el agua y el sustrato por espacio de cuatro semanas. En la superficie del líquido en reposo del cultivo que tenía como sustrato piloncillo se formó una nata gruesa, y en la superficie del cultivo que tuvo como sustrato melaza se formó una película pulverulenta.

De ambos cultivos se tomaron muestras de la nata formada en la superficie, del líquido sobrenadante y de los típicos, mismas que fueron sometidas a un análisis micológico para conocer si existían diferencias en la composición de la micobiota cuando se utilizan sustratos diferentes.

Para aislar las levaduras de la nata que se formó en el cultivo que tuvo como sustrato piloncillo, se sembró ésta en estrias múltiples sobre placas de agar. Se hicieron siembras tanto de la parte externa como de la interna puesto que la nata era gruesa. Esto se realizó cortando la nata con un bisturí estéril, de manera que la parte interna quedara expuesta. En total se sembraron 24 placas, 12 de la parte externa y 12 de la parte interna de las cuales 6 tenían como medio de cultivo glucosa - extracto de levadura - peptona - agar (GELPA: glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agar 20 g, agua destilada 1000 ml) y 6 tenían como medio de cultivo glucosa-carbonato de calcio (GELCA: glucosa 50g, extracto de levadura 5g, carbonato de calcio 5g, agar 20 g, agua destilada 1000 ml). De esta nata no se hicieron diluciones puesto que era muy correosa y difícil de

disolver o moler.

Para aislar las colonias de levaduras de la película pulverulenta formada en el cultivo que tuvo como sustrato melaza se usó el método de agotamiento por estrias múltiples, que consistió en sembrar una asada de la película en tres placas de agar, de esta forma se sembraron 24 placas, 12 en GELPA y 12 en GELCA.

Para aislar las levaduras del líquido fermentado de ambos cultivos se hicieron diluciones en serie en agua peptonada al 0.12 % hasta llegar a $1/10^{10}$. De las diluciones $1/10^6$, $1/10^8$ y $1/10^{10}$ se sembraron 10 placas de agar, 5 en GELPA y 5 en GELCA cada una de las cuales se inoculó con 0.5 ml de la dilución.

Las microbiogreas de ambos cultivos se sembraron por el método de estrias múltiples en placas de agar; de cada cultivo se sembraron 10 cajas, 5 en GELPA y 5 en GELCA.

Las placas ya inoculadas se incubaron a 25°C durante 5 días. Se aislaron las colonias de levaduras. Los cultivos axénicos obtenidos durante el estudio se mantuvieron en tubos con GELPA inclinado e incubados a 25°C .

Todos los aislamientos se trabajaron en el Laboratorio de Micología y Fitopatología del Instituto de Biología de la UNAM.

Las colonias de levaduras fueron aisladas, mantenidas e identificadas a especie siguiendo los métodos de aislamiento, mantenimiento clasificación e identificación de van der Walt y Yarrow (1984); las diagnósis para *Candida* y

Pichia de Meyer, Ahearn y Yarrow (1984), y las claves taxonómicas de Kreger van-Rij y Yarrow (1984).

4.5. Efecto de dos sustratos estériles y no estériles en el cultivo de tībicos.

Para saber si el tipo de sustrato usado, así como si la esterilidad de éste, afectaba de alguna manera el crecimiento de los tībicos se realizó el siguiente experimento.

Se mentaron ocho cultivos de tībicos de la siguiente manera:

Cultivo	Sustrato	Procedencia original	Agua
	25 g	del inóculo	100 ml
A	Piloncillo estéril	Piloncillo	Estéril
B	Piloncillo estéril	Melaza	Estéril
C	Melaza estéril	Melaza	Estéril
D	Melaza estéril	Piloncillo	Estéril
E	Piloncillo no estéril	Piloncillo	No estéril
F	Piloncillo no estéril	Melaza	No estéril
G	Melaza no estéril	Melaza	No estéril
H	Melaza no estéril	Piloncillo	No estéril

Al decir procedencia original del inóculo significa que los tībicos habían sido cultivados anteriormente en ese

sustrato, y el objeto de cambiarlos de sustrato fue el de ver si los cultivos desarrollaban las mismas características que se apreciaban con el anterior sustrato o si era el nuevo medio el que las determinaría.

Al mismo tiempo, el objeto de este experimento fue el de conocer si son los tóxicos o es la esterilidad del sustrato la que determina de alguna manera las diferencias en el desarrollo de los cultivos.

Todos los cultivos se montaron con las condiciones óptimas ya descritas en cuanto a cantidad de tóxicos, sustrato y agua.

Los sustratos se esterilizaron en autoclave por espacio de 10 min a 15 lbs de presión.

Los cultivos se mantuvieron por espacio de un mes con tapones de algodón y a temperatura ambiente y se hicieron observaciones de los cultivos cada ocho días.

5. Resultados y discusión.

5.1. Efecto del pH inicial.

Sin importar cuál fuera el valor de pH inicial, a las 24 horas todos los lotes tenían un pH de 3. Esto se debió a la producción constante de ácido por los microorganismos, lo que ayuda a que no proliferen otros organismos en los cultivos de tибicos, puesto que no todos los microorganismos pueden crecer y desarrollarse en medios ácidos.

Para el caso de la concentración de etanol bajo los diferentes valores iniciales de pH se vio que los efectos de los tratamientos resultaron ser estadísticamente diferentes. El lote 1 ($\text{pH}_i = 3$) resultó ser superior a los lotes restantes; esta diferencia positiva pudo deberse al tipo de solución amortiguadora utilizada. De cualquier manera, para obtener alcohol a partir de fermentaciones con tибicos, el control del pH inicial no representa gran ayuda puesto que llevándolo a términos prácticos la diferencia observada no es muy grande (ver cuadro 1).

En cuanto al ácido acético producido se observó que, en este conjunto de datos, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los efectos de los distintos valores de pH inicial sobre la concentración del ácido, siendo el lote 2 ($\text{pH}_i = 5.5$) el que proporcionó el mayor contenido de ácido acético. El lote control tuvo un pH

Inicial de 5, por lo que se esperaba que el contenido de ácido acético fuera similar o muy cercano al lote 2, pero no resultó de esta manera, quizá debido al tipo de solución amortiguadora utilizada que pudo tener un efecto directo como precursor de este ácido (ver cuadro 2).

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los efectos producidos por los distintos valores de pH inicial sobre la producción de biomasa a las 72 horas de haber sido montados los cultivos. La diferencia que se aprecia se da entre los lotes 1 (pH = 3) y el lote cuatro (control, pH = 5), siendo este último el que proporcionó una mayor cantidad de biomasa. Puesto que la mayor producción de biomasa se obtuvo en el lote al que no se le modificó el pH inicial (control), se puede decir que no es necesario controlar este parámetro cuando lo que se busca es un mayor rendimiento de biomasa, al menos, para las condiciones con las que se trabajó (ver cuadro 3).

5.2. Efecto de la aireación.

Los valores promedio de biomasa, etanol y ácido acético resultaron ser estadísticamente iguales entre los cuatro tratamientos de aireación, y tampoco se vió diferencia al compararlos con el lote control (ver cuadros 4, 5 y 6) Por lo tanto, se puede decir que la aireación no es un factor que deba ser controlado, y que de haber resultado lo

contrario esto implicaría un aumento en el costo de la producción de tибicos. Cabe recordar (como ya se mencionó en la metodología) que la aireación de los cultivos no fue constante y esto pudo haber alterado significativamente los resultados.

5.3. Efecto del tipo de sustrato en la concentración de etanol y ácido acético.

Estadísticamente, existieron diferencias en los efectos producidos por los diferentes sustratos utilizados sobre el contenido de etanol y ácido acético. El menor contenido de ambos se obtuvo en los cultivos que tuvieron como sustrato la sacarosa, y el mayor en los cultivos que tuvieron como sustrato la melaza (ver cuadros 7 y 8). Esto se debe a que la melaza tiene una composición mucho más rica que el piloncillo, y estos dos a su vez son más completos (como sustrato) que la sacarosa porque cuentan con varios azúcares además de vitaminas y la sacarosa es un solo azúcar, y no todos los microorganismos pueden utilizarla. Por lo tanto, para obtener una concentración mayor de etanol o de ácido acético, ya sea para hacer bebidas refrescantes o para producir vinagre casero con tибicos, lo que se recomienda usar como sustrato es la melaza, o bien, complementar el piloncillo y la sacarosa con vitaminas y otros factores de crecimiento.

5.4. Levaduras encontradas en los tибicos y en los sustratos fermentados estudiados.

Siguiendo las claves de Kreger - van Rij, una de las cepas procedentes de tибicos cultivados en piloncillo fue identificada como *Candida famata* (Harrison) Meyer et Yarrow (ver cuadros 9 y 10). Todas las pruebas coincidieron con la clave, excepto la asimilación del ácido láctico, que debía haber resultado positiva y en este caso se presentó débil. Siguiendo la misma clave, la otra levadura aislada fue identificada como *Candida valida* (Leberle) (ver cuadros 9 y 10), que es el estado asexual de *Pichia membranaefaciens* Hansen; esta fue encontrada tanto en líquido y tибicos de cultivos que tenían como sustrato la melaza, como en cultivos que tenían como sustrato el piloncillo, siendo muy abundante en la película pulverulenta que se formó en la superficie de los cultivos en melaza en reposo, película que estuvo constituida casi en su totalidad por pseudomicelio de esta levadura.

En los tибicos no se habían encontrado las especies de levaduras aquí registradas, aunque *Candida valida* y su estado sexual *Pichia membranaefaciens* ya habían sido aisladas de varios alimentos y bebidas fermentados, como el pozol, el tesgüino, el pulque, la tuba y el colonche (Ulloa et al. 1987; Lappe, 1988), por lo que no resulta raro haberla encontrado también en tибicos y en el líquido

sobrenadante del cultivo de éstos. Con respecto a *Candida famata*, ésta había sido aislada del hongo del té y del pozol de mamey de la zona lacandona (Kozaki, *et al.* 1972; Calderón y Herrera, 1989 ; Herrera y Calderón, 1989).

5.5. Efecto de dos sustratos estériles y no estériles en el cultivo de tибicos.

Tomando en cuenta que el piloncillo y la melaza son obtenidos por medio de procesos diferentes, también lo es su composición química. Esta diferencia es la que da la pauta para provocar el crecimiento dispar de los cultivos cuando se utilizan los dos diferentes sustratos.

Siempre que el sustrato fue piloncillo, sin importar su esterilidad, se formó una nata blanca y brillante en la superficie (ver cuadro 11), parecida a la madre del vinagre, que por referencias bibliográficas se sabe que tiene una matriz de celulosa que es sintetizada por *Acetobacter xylinum* (Hibbert, 1931; Hestrin, 1954), y no hubo formación de burbujas; esto sucedió en los cuatro cultivos que tuvieron como sustrato el piloncillo, sin importar tampoco el sustrato original en el que habían sido cultivados anteriormente. Esta nata formada en los cultivos que tuvieron como sustrato el piloncillo, al igual que los tибicos, puede ser utilizada para alimentar animales de traspatio; de hecho, ya se han realizado experimentos en los

que se incluye esta nata en el alimento balanceado de los animales, siendo ésta aceptada y adecuada cuando se utiliza en ciertas proporciones (Ulloa et al., 1987). Esta misma nata es consumida en las Filipinas por los humanos, que la comen como dulce con helado o con ensaladas de frutas (Mendoza, 1961; Ramos 1977).

Cuando el sustrato fue melaza, también sin importar la esterilidad del cultivo ni el origen de los tibicos, siempre se formó una película pulverulenta en la superficie, de color crema o amarillento, la cual está constituida principalmente por pseudomicelio de *Candida valida*, aunque se encontraron también algunas bacterias. En las últimas dos semanas se observó la formación de burbujas siendo éstas más abundantes cuando se usaron tibicos que originalmente habían sido cultivados con piloncillo (ver cuadro II).

En el fondo de los recipientes que contenían los cultivos no hubo ninguna diferencia apreciable.

Cuadro 1. Producción de etanol por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo con diferente pH inicial.

		<i>Nivel de pH (inicial)</i>			
		3.0	5.5	8.0	5.0(control)
Repetición					
Etanol mg/ml	1	24.4320	18.2947	16.2239	17.2370
	2	22.4480	18.5005	17.0217	21.5450
	3	23.9192	18.1008	15.6433	17.5420
	4	23.2726	19.0301	16.1659	20.6880

Cuadro 2. Producción de ácido acético por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo con diferente pH inicial.

		<i>Nivel de pH (inicial)</i>			
		3.0	5.5	8.0	5.0(control)
Repetición					
Acido acético mg/ml	1	0.5310	0.6574	0.3802	0.4040
	2	0.4050	0.7906	0.3903	0.4941
	3	0.4920	0.6238	0.3472	0.5149
	4	0.4400	0.6923	0.3788	0.4019

Cuadro 3. Producción de biomasa por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo con diferente pH inicial.

		<i>Nivel de pH (inicial)</i>			
		3.0	5.5	8.0	5.0(control)
Repetición					
Biomasa g	1	16.12	17.08	17.10	19.48
	2	17.17	16.45	16.84	18.37
	3	17.38	17.00	17.28	17.61
	4	15.77	16.83	17.14	17.48

Cuadro 4. Producción de etanol por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo bajo diferentes condiciones de aireación

		<i>Volumen de aire en cm³/min</i>				
		17.84	72.50	108.00	157.60	Control
Repetición						
Etanol mg/ml	1	17.3933	13.9809	14.2452	11.3809	19.4394
	2	17.1225	14.0859	15.9155	18.4993	16.3685
	3	12.3126	11.6859	8.8636	7.9723	12.1455
	4	9.8708	14.9172	10.3684	8.3018	11.1842

Cuadro 5. Producción de ácido acético por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo bajo diferentes condiciones de aireación.

		Volúmen de aire en cm^3/min				
		17.84	72.50	108.00	157.60	Control
Repetición						
	1	0.3301	0.3804	0.3629	0.3133	0.5004
Acido	2	0.4262	0.3727	0.4049	0.5225	0.4707
acético	3	0.3991	0.3673	0.3764	0.3818	0.4745
mg/ml	4	0.4269	0.4220	0.4769	0.3073	0.5712
	5	0.2240	0.3057	0.3769	0.2656	0.3205

Cuadro 6. Producción de biomasa por tībicos cultivados en soluciones de piloncillo bajo diferentes condiciones de aireación.

		Volúmen de aire en cm^3/min				
		17.84	72.50	108.00	157.60	Control
Repetición						
	1	16.03	17.41	16.10	15.97	15.61
Biomasa	2	15.96	15.42	16.61	16.23	15.01
g	3	14.25	16.00	13.90	14.74	14.23
	4	15.18	14.39	15.30	14.82	15.83
	5	16.46	17.00	16.21	16.23	14.63

Cuadro 7. Producción de etanol por tībicos cultivados en diferentes sustratos.

		S u s t r a t o		
		Piloncillo	Melaza	Sacarosa
Repetición				
	1	15.2370	27.6733	3.9347
Etanol	2	11.6643	37.3830	2.7039
mg/ml	3	15.3141	34.2676	3.4974
	4	15.1416	36.6341	3.3300

Cuadro 8. Producción de ácido acético por tībicos cultivados en diferentes sustratos.

		S u s t r a t o		
		Piloncillo	Melaza	Sacarosa
Repetición				
Acido	1	0.3953	0.7967	0.3450
acético	2	0.3623	0.8616	0.2705
mg/ml	3	0.8049	0.7782	0.3413
	4	0.8852	0.8300	0.3305

Cuadro 9. Características morfológicas de las especies de levaduras estudiadas.

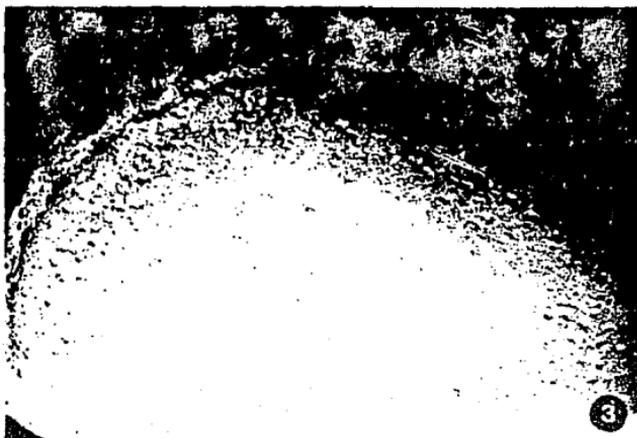
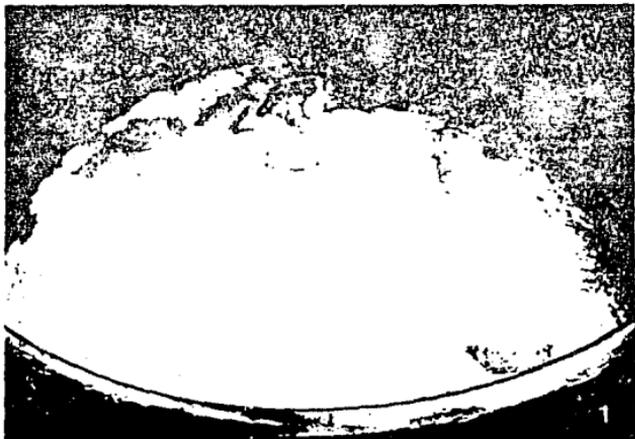
<i>Candida valida</i>	<i>Candida famata</i>
A. Macromorfología o características de los cultivos	
1. Crecimiento en medio líquido (GELP)	
Sedimento abundante, película blanca, opaca, seca y con anillo ascendente	Poco sedimento, película poco abundante
2. Crecimiento en medio sólido (GELPA)	
Colonia de aproximadamente 2.5 cm de diámetro a los 30 días. Color crema, opaca, seca y rugosa. Surcos radiales poco evidentes, borde continuo (figura 4)	Colonia de aproximadamente 2 cm de diámetro a los 30 días. Blanca cremosa, poco brillante, centro umbonado y borde ligeramente lobado. Surcos radiales poco marcados (figura 8)
B. Micromorfología	
1. Características de las células vegetativas	
a) Morfología en medio sólido (AML, GELPA, HMA)	
Células ovoides a elongadas de 5.5 a 9.6 μm x 3.5 a 5.6 μm (figura 5)	Células redondas, de 2 a 4.5 μm (figura 11)
b) Formación de pseudomicelio en placa de Dalmau (HMA)	
Pseudomicelio bien desarrollado tanto en anaerobiosis como en aerobiosis (figura 7)	Pseudomicelio ausente (figura 10)
2. Características de la reproducción asexual	
Gemación multipolar (figura 6)	Gemación multipolar (figura 9)
3. Características de la reproducción sexual (AML, FW, GELPA, GKA)	
Ausente	Ausente
<hr/> AML agar para morfología de levaduras GELPA glucosa-extracto de levadura-peptona-agar HMA harina de maíz-agar FW Fowell-agar GKA Corodkova-agar	

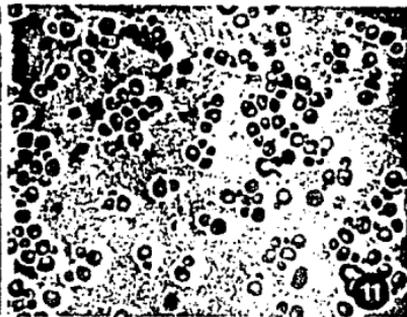
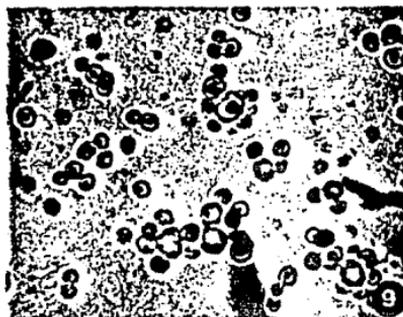
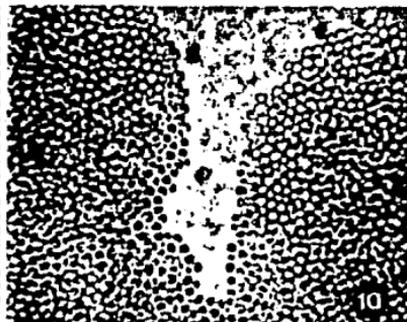
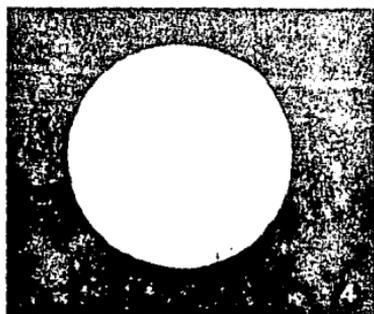
Cuadro 10. Características fisiológicas y bioquímicas de las especies de levaduras estudiadas.

	<i>Candida valida</i>	<i>Candida famata</i>
1. Utilización de compuestos de carbono		
a) Fermentación	-	-
b) Asimilación		
Galactosa	-	+
Sacarosa	-	+
Maltosa	-	+
Celobiosa	-	+
Trealosa	-	+
Lactosa	-	-
Rafinosa	-	+
Alm. sol.	-	-
D-Xilosa	-	+
L-Arabinosa	-	+
D-Ribosa	-	-
L-Ramnosa	-	-
Eritritol	-	+
Ribitol	-	+
D-Manitol	-	+
Ac. Succínico	+	+
Ac. Cítrico	-	-
Inositol	-	-
L-Sorbosa	-	+
Melibiosa	-	-
Melecitosa	-	+
Inulina	-	-
D-Arabinosa	-	-
Glucosamina	-	-
Glucitol	-	+
α -Metil-D-glucósido	-	+
Salicina	-	+
D-Gluconato	-	+
Ac. Láctico	+	+ débil
Etanol	+	

Cuadro 10. (continuación)

	<i>Candida valida</i>	<i>Candida famata</i>
2. Utilización de compuestos de nitrógeno		
a) Asimilación de KNO ₃	-	-
3. Requerimiento de vitaminas		
a) Crecimiento sin vitaminas	+	-
4. Crecimiento en medios de alta presión osmótica		
a) Glucosa al 50 %	-	-
b) Glucosa al 60 %	-	-
c) Glucosa - NaCl	-	+
5. Crecimiento a 37° C	+	+
6. Reacción al DBB	-	-





Cuadro 11. Características presentes en cultivos de tópicos
con sustratos estériles y no estériles.

Sustrato original	Sustrato	Características de la superficie		
		Formación de nata	Formación de película pulverulenta	Formación de burbujas
Piloncillo	Piloncillo estéril	A los 16 días	Ausente	Ausente
Melaza	" "	A los 16 días	Ausente	Ausente
Melaza	Melaza estéril	Ausente	A los 8 días	A los 24 días
Piloncillo	" "	Ausente	A los 8 días	A los 31 días
Piloncillo	Piloncillo no estéril	A los 16 días	Ausente	Ausente
Melaza	" "	A los 16 días	Ausente	Ausente
Melaza	Melaza no estéril	Ausente	A los 16 días	Escasa
Piloncillo	" "	Ausente	A los 16 días	A los 24 días

6. CONCLUSIONES

La concentración de etanol se ve poco afectada positivamente con el uso de una de las soluciones amortiguadoras; lo mismo pasa para la concentración de ácido acético. El control del pH inicial no es importante cuando lo que se busca es una mayor producción de biomasa. Se necesita experimentar más en este campo para poder afirmar que tipo de soluciones favorecen o son precursoras de alcoholes o de ácidos en cultivos de tíficos.

La aireación no es un factor importante de controlar puesto que los valores promedio de biomasa, concentración de etanol y de ácido acético fueron iguales.

Se recomienda la melaza como el mejor sustrato para obtener concentraciones más elevadas de etanol y ácido acético; en segundo lugar se recomienda el piloncillo. La sacarosa, por la necesidad de complementarla, se puede desechar como opción para producir vinagre casero con tíficos.

En lo referente a la microbiota de los tíficos y del líquido fermentado de los cultivos se encontraron dos especies de levaduras que no habían sido registradas para tíficos, éstas son *Candida valida* (Leberle) y *Candida famata* (Harrison) Meyer.

El uso de la melaza y el piloncillo como sustratos en cultivos de tíficos hacen que éstos se desarrollen de manera diferente. La melaza favorece el desarrollo de la película

pulverulenta color crema en la superficie del cultivo así como la formación de burbujas, el piloncillo favorece la formación de una nata blanca en la superficie.

APENDICE

ANALISIS ESTADISTICO

De acuerdo a los objetivos de este estudio y dado que se cuenta con un solo factor de interés, se decidió realizar el análisis utilizando un modelo que recibe el nombre de modelo balanceado con un criterio de clasificación o un modelo de diseño completamente al azar balanceado. El modelo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, a, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

donde

Y_{ij} representa el valor registrado de la respuesta variable bajo estudio en la j -ésima repetición del j -ésimo tratamiento.

μ representa la media global de la variable respuesta.

τ_i representa el efecto debido al i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} representa un término de error aleatorio.

Sobre este término de error se hacen las suposiciones usuales de normalidad, media cero, varianza constante e independencia de los errores.

Este modelo permite probar la hipótesis de igualdad de tratamientos, que, como se menciona anteriormente, es la hipótesis de interés en este estudio. El análisis de varianza correspondiente se presenta en el cuadro 1 del apéndice.

Por otra parte, cuando en el análisis de un modelo de este tipo de concluye que los efectos de los tratamientos no

son iguales sobre la variable respuesta, es necesario determinar los tratamientos estadísticamente distintos. A las técnicas que se aplican para detectar este tipo de diferencias se les conoce como de comparaciones múltiples. En este trabajo se utilizó la prueba conocida bajo el nombre de contrastes de Scheffé.

Además para cada conjunto de datos se incluyen las gráficas de los intervalos de confianza asociados a las medias de cada tratamiento.

Una discusión de los procedimientos involucrados tanto en la prueba de igualdad de tratamientos y en la prueba de Scheffé como en los intervalos de confianza puede encontrarse en Cochran y Cox (1957), Hicks (1973) y Montgomery (1976).

Para facilitar el manejo de la información, se asociaron índices a los diferentes niveles de los tratamientos para cada conjunto de datos. La notación fue la siguiente:

Para los experimentos en que se controló el pH inicial

pH inicial	Indice
3.0	1
5.5	2
8.0	3
(control) 5.0	4

Para los experimentos en que se controló el volúmen de aire

Vol. de aire cm^3/min	Indice
17.84	1
72.50	2
108.00	3
156.60	4
Control	5

Para los experimentos en que se controló el tipo de sustrato

Sustrato	Indice
Piloncillo	1
Melaza	2
Sacarosa	3

A continuación se describe el análisis estadístico efectuado a cada uno de los conjuntos de datos.

Etanol producido en cultivos de tibicos con diferentes niveles iniciales de pH.

Para este caso, los efectos de los tratamientos resultan ser estadísticamente diferentes con un valor de la estadística de prueba de 24.64 ($p < 0.0005$), como puede apreciarse en el cuadro 2 del apéndice. Dado que existen diferencias entre los tratamientos, se aplicaron contrastes de Scheffé y se obtuvo que el efecto del tratamiento 1 resulta estadísticamente diferente y superior a los efectos de los tratamientos restantes. Por otra parte, los efectos de los tratamientos 3 y 4 resultan estadísticamente diferentes entre sí (utilizando un nivel de significancia de 0.05), proporcionando mayor cantidad de etanol el tratamiento 4 que el 3. El efecto del tratamiento 2 no se puede distinguir de los efectos de los tratamientos 3 y 4.

Acido acético producido en cultivos de tibicos con diferentes niveles iniciales de pH.

En este conjunto de datos existen diferencias significativas entre los efectos de los distintos valores de pH inicial sobre el contenido de ácido acético teniéndose un valor de la estadística de prueba de 24.66 ($p < 0.0005$) como

puede observarse en el cuadro 3 del apéndice. Aplicando contrastes de Scheffé se tiene que los efectos de los tratamientos 3, 4 y 1 son iguales entre sí y diferentes al tratamiento 2, el cual proporciona el contenido de ácido acético mayor.

Biomasa producida en cultivos de tibicos con diferentes niveles iniciales de pH.

Para este conjunto de datos, puede observarse del cuadro 4 del apéndice que la estadística de prueba tomó un valor de 5.29 con $p = 0.015$. Si la prueba se realiza con un nivel de significancia de 0.05 se declaran diferencias significativas entre los efectos producidos por los distintos niveles de pH inicial. Utilizando contrastes de Scheffé se tiene que los efectos de los tratamientos 1 y 4 son estadísticamente diferentes, teniéndose que el nivel 4 proporciona una mayor cantidad de biomasa que el nivel 1. Por otra parte, los efectos de los tratamientos 2 y 4 son estadísticamente iguales y no es posible distinguirlos de los efectos producidos por los tratamientos 1 y 4.

Etol producido en cultivos de tibicos bajo diferentes condiciones de aireación.

Los resultados de la prueba de igualdad de efectos de tratamientos para este conjunto de datos se resumen en el cuadro 5 del apéndice. De este cuadro se observa que el valor de la estadística de prueba asociada es 1.26 con

$p=0.32$, lo cual permite afirmar que los efectos de las diferentes condiciones de aireación en la cantidad de etanol producida pueden considerarse estadísticamente iguales.

Acido acético producido en cultivos de tибicos bajo diferentes condiciones de aireación.

En este caso, y de acuerdo al cuadro 6 del apéndice, se tiene que la estadística de prueba es 1.75 con $p=0.179$, lo cual brinda fuerte evidencia que indica igualdad de efectos entre las condiciones de aireación experimentadas.

Biomasa producida en cultivos de tибicos bajo diferentes condiciones de aireación.

Para este conjunto de datos los resultados de la hipótesis de igualdad de tratamientos se resumen en el cuadro 7 del apéndice. De este cuadro se observa que el valor de la estadística de prueba resultó 0.69 y el nivel de significancia descriptivo (p) asociado a este contraste es $p=0.61$, lo cual se traduce en fuerte evidencia a favor de que los efectos de las diferentes condiciones de aireación en la cantidad de biomasa producida son iguales.

Producción de etanol en cultivos de tибicos en tres diferentes sustratos.

Del cuadro 8 del apéndice se tiene que el valor de la estadística de prueba es 125.93 ($p<0.0005$) lo cual brinda

fuerte evidencia que indica que existen diferencias en los efectos producidos por los diferentes sustratos utilizados sobre el contenido de etanol. Utilizando contrastes de Scheffé se encuentra que los 3 tratamientos son diferentes entre sí, proporcionando el menor contenido de etanol el tratamiento 3 y el mayor el tratamiento 2.

Producción de ácido acético en cultivos de tíficos en tres diferentes sustratos.

Para este conjunto de datos y de acuerdo al cuadro 9 del apéndice se tiene que la estadística de prueba toma un valor de 9.72 con $p < 0.0005$, lo cual indica extrema evidencia para afirmar que los efectos de los distintos sustratos sobre el contenido de ácido acético son estadísticamente diferentes. Utilizando contrastes de Scheffé se tiene que no es posible discriminar el efecto del tratamiento 1, pero en el caso de los tratamientos 2 y 3 que resultan estadísticamente diferentes el 3 proporciona menor contenido de ácido acético.

Por último, una descripción gráfica de los niveles promedio obtenidos en cada tratamiento y de sus límites de confianza puede encontrarse en las gráficas 1 - 8 del apéndice.

CONCLUSIONES DEL ANALISIS ESTADISTICO

Las conclusiones se presentan para cada conjunto de datos.

Contenido de etanol en diferentes niveles iniciales de pH.

En este caso, el contenido promedio de etanol resultó estadísticamente diferente en los distintos niveles de pH considerados. El nivel de pH inicial de 3.0 proporcionó en promedio el mayor contenido de etanol, siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos. Por otra parte los niveles iniciales de 8.0 y 5.0 proporcionaron diferencias significativas en el contenido de etanol siendo superior el resultado promedio con nivel inicial de 5.0. El efecto del tratamiento con nivel inicial de 5.5 no fue posible diferenciarlo de los efectos de los tratamientos con niveles 8.0 y 5.0.

Contenido de ácido acético en diferentes niveles iniciales de pH.

Para este conjunto de datos se obtuvo que existen diferencias en el contenido promedio de ácido acético producido en los diferentes niveles ensayados. El nivel inicial de pH de 5.5 produjo una respuesta estadísticamente superior al resto de los tratamientos. Los niveles 3.0 5.0 y 8.0 produjeron resultados estadísticamente iguales en el contenido promedio de ácido acético.

Biomasa en diferentes niveles iniciales de pH.

En este conjunto de datos se obtuvo que si existen diferencias significativas en la cantidad promedio de biomasa, siendo el control el que proporcionó la mayor cantidad promedio de biomasa y resultando estadísticamente diferente a la cantidad promedio de biomasa que se obtuvo con un pH inicial de 3. Los efectos de los niveles iniciales de pH de 5.5 y 8.0 son estadísticamente iguales y no es posible, en presencia de la variabilidad de datos, distinguirlos de los efectos producidos por el pH inicial de 3.0 y el control.

Contenido de etanol en diferentes condiciones de aireación.

En este caso el contenido promedio de etanol es el mismo en los cuatro volúmenes de aire (cm^3/min) que se ensayaron, así como en el control.

Contenido de ácido acético en diferentes condiciones de aireación.

Los resultados en este caso indican que el contenido promedio de ácido acético es el mismo en los cuatro volúmenes de aire (cm^3/min) que se experimentaron, así como en el control.

Biomasa en diferentes condiciones de aireación.

Para este conjunto de datos se tiene que los volúmenes de

aire (cm^3/min) proporcionaron en promedio la misma cantidad de biomasa, así como el control.

Contenido de etanol en diferentes sustratos.

En este caso, el piloncillo, la melaza y la sacarosa producen contenidos promedio de etanol estadísticamente diferentes. El menor contenido promedio de etanol es producido en la sacarosa, siguiéndole el producido en piloncillo y siendo el mayor el asociado a la melaza.

Contenido de ácido acético en diferentes sustratos.

Para este conjunto de datos el contenido promedio de ácido acético es estadísticamente diferente en los sustratos de melaza y sacarosa produciendo mayores cantidades el sustrato de melaza. La variabilidad en este caso no permitió distinguir el efecto del piloncillo del resto de los sustratos.

Cuadro 1. Análisis de varianza para el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + c_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, a, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	$\sum_{i=1}^a (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2$	a - 1	$\frac{SCH}{a-1}$	$\frac{(n-a) SCH}{(a-1) SCE}$	
Error	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	n - a	$\frac{SCE}{n-a}$		
Total	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2$	n - 1	$\frac{SCT}{n-1}$		

SCH: Suma de cuadrados debida a la hipótesis

SCE: Suma de cuadrados debida al error

SCT: Suma de cuadrados total

Cuadro 2. Análisis de varianza de la producción de etanol por tíficos en cultivos con diferente pH inicial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	110.629	3	36.876	24.642	<0.0005
Error	17.958	12	1.496		
Total	128.587	15			

Contrastes de Scheffé

τ_3	τ_2	τ_4	τ_1	F	P
-1	0	0	1	23.44	<0.0005
0	-1	0	1	11.30	<0.001
-1	0	1	0	3.98	0.25 < P < 0.05
0	-1	1	0	0.26	>0.075
-1	1	0	0	2.19	>0.10
0	0	-1	1	8.10	<0.005

Cuadro 3. Análisis de varianza de la producción de ácido acético por tíficos en cultivos con diferente pH inicial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	0.222	3	0.074	24.655	<0.0005
Error	0.036	12	0.003		
Total	0.258	15			

Contrastes de Scheffé

τ_3	τ_4	τ_1	τ_2	F	P
-1	0	0	1	21.88	<0.0005
0	-1	0	1	12.39	<0.001
-1	0	1	0	1.92	0.10 < P < 0.25
0	0	-1	1	11.17	<0.001

Cuadro 4. Análisis de varianza de la biomasa de tībicos producida en cultivos con diferente pH inicial.

Fuente de variaci3n	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hip3tesis	6.243	3	2.081	5.294	0.014
Error	4.718	12	0.393		
Total	10.961	15			

Contrastes de Scheff3

τ_1	τ_2	τ_3	τ_4	F	P
-1	0	0	1	4.47	0.025
0	-1	0	1	3.29	0.05
-1	0	1	0	0.39	0.75

Cuadro 5. Análisis de varianza de la producci3n de etanol por tībicos en cultivos bajo diferentes condiciones de aireaci3n.

Fuente de variaci3n	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hip3tesis	64.437	4	16.109	1.225	0.320
Error	256.708	20	12.835		
Total	321.145	24			

Cuadro 6. Análisis de varianza de la producción de ácido acético por tībicos en cultivos bajo diferentes condiciones de aireación.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	0.042	4	0.010	1.747	0.179
Error	0.119	20	0.006		
Total	0.161	24			

Cuadro 7. Análisis de varianza de la producción de biomasa por tībicos en cultivos bajo diferentes condiciones de aireación.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	2.429	4	0.607	0.689	0.608
Error	17.627	20	0.881		
Total	20.056	24			

Cuadro 8. Análisis de varianza de la producción de etanol por tибicos cultivados en diferentes sustratos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	1925.736	2	962.868	125.925	<0.0005
Error	68.817	9	7.646		
Total	1994.553	11			

Contrastes de Scheffé

τ_3	τ_1	τ_2	F	P
-1	0	1	122.64	<0.0005
0	-1	1	50.50	<0.0005
-1	1	0	15.75	<0.005

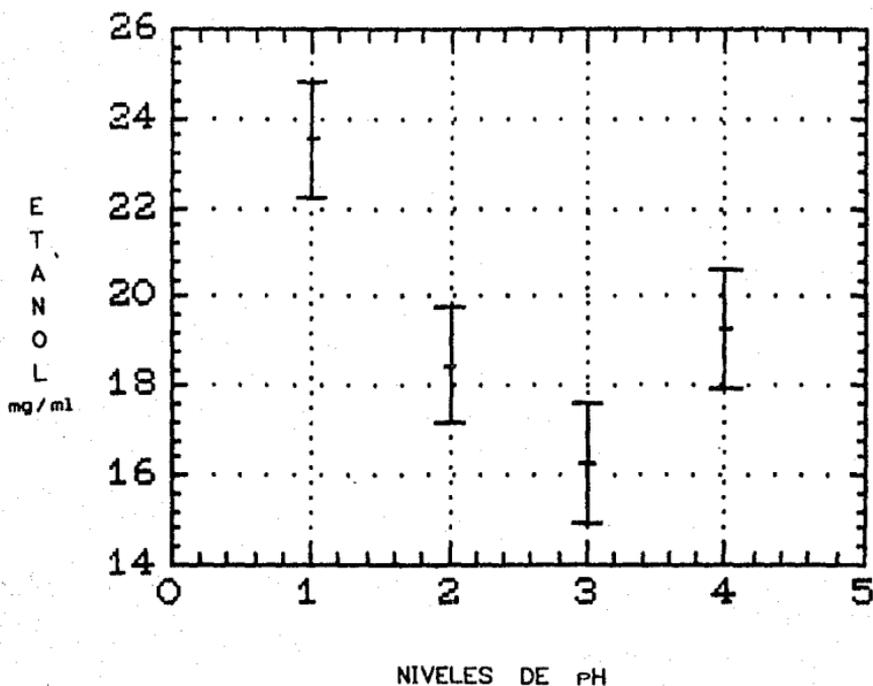
Cuadro 9. Análisis de varianza de la producción de ácido acético por tибicos cultivados en diferentes sustratos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	P
Hipótesis	0.494	2	0.247	9.724	<0.005
Error	0.229	9	0.025		
Total	0.723	11			

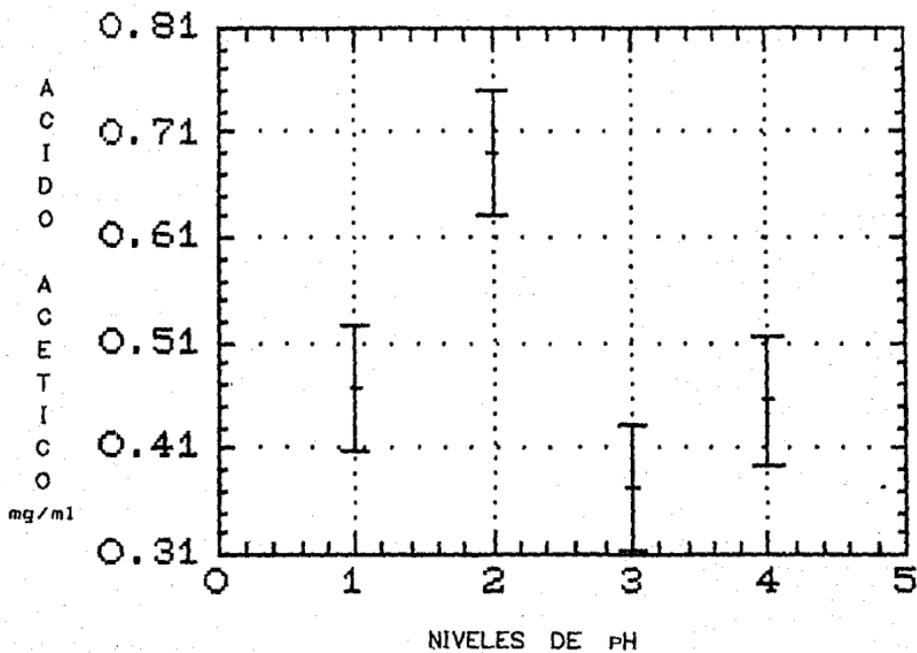
Contrastes de Scheffé

τ_3	τ_1	τ_2	F	P
1	-1	0	3.31	0.10
0	1	-1	1.65	0.25
-1	0	1	9.60	<0.01

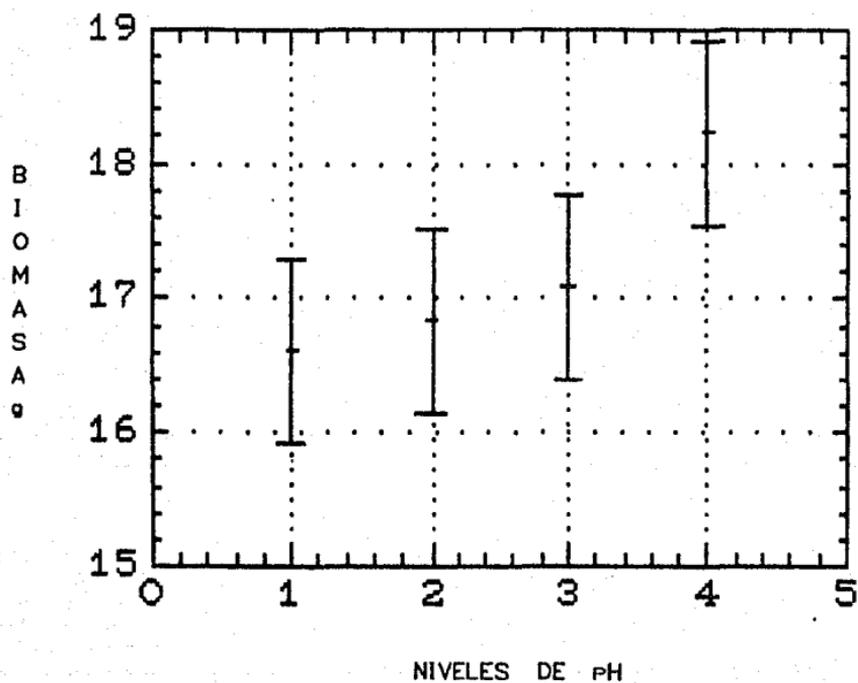
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



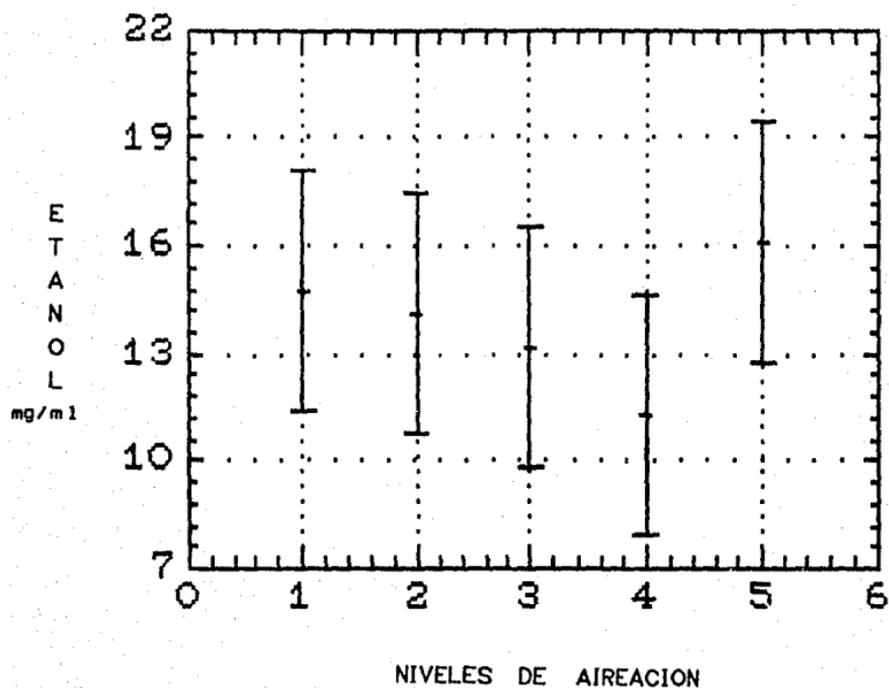
Gráfica 1. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



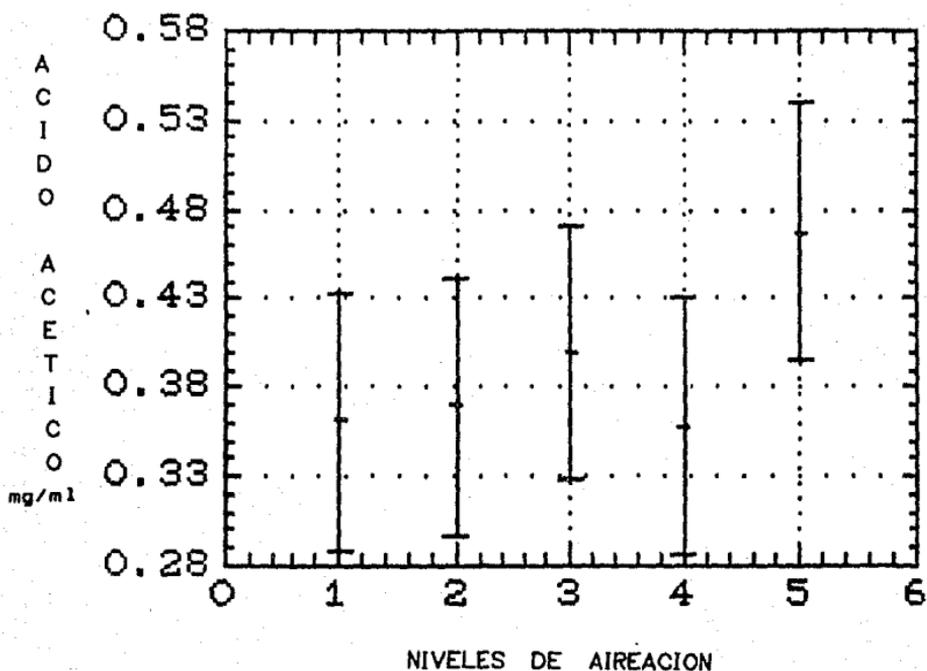
Gráfica 2. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



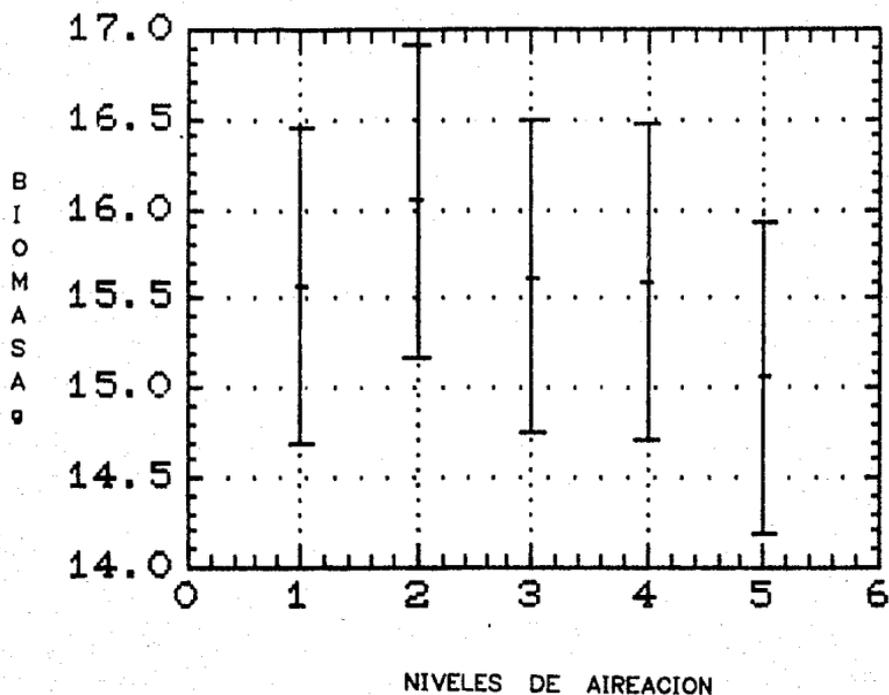
Gráfica 3. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



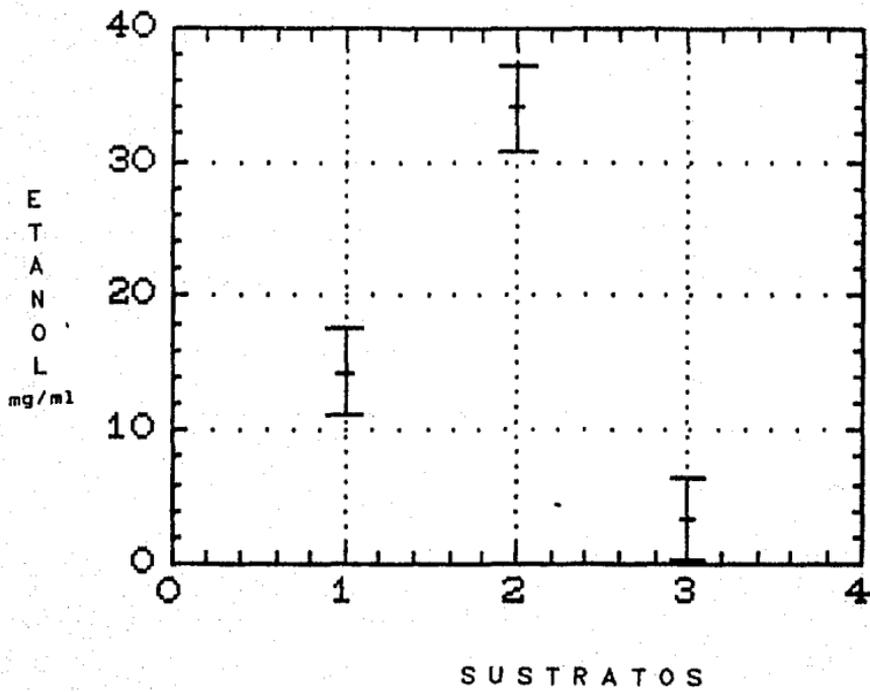
Gráfica 4. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



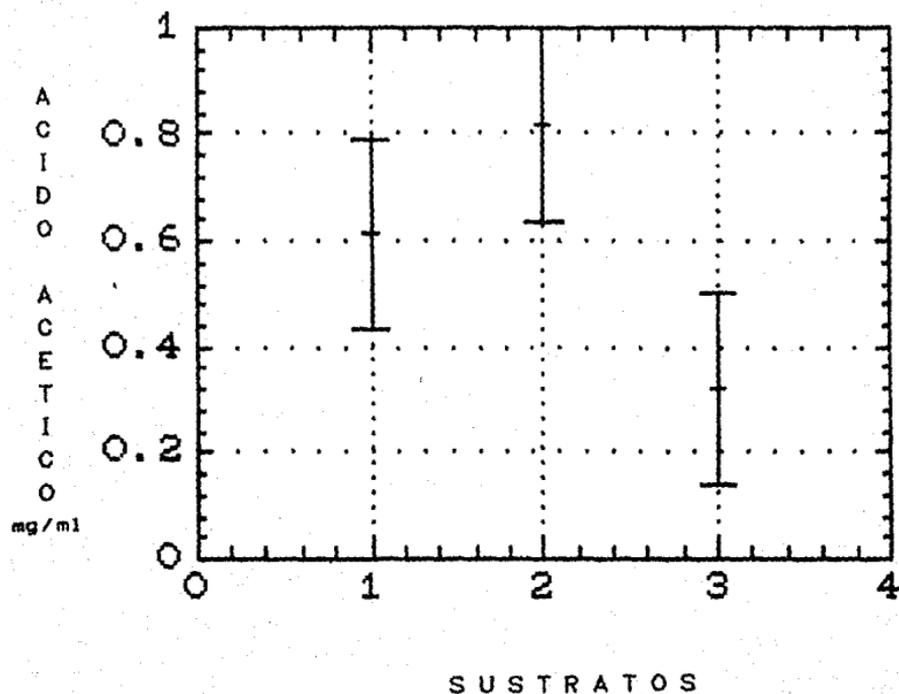
Gráfica 5. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



Gráfica 6. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



Gráfica 7. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.



Gráfica B. Intervalos de confianza para las medias de los niveles.

BIBLIOGRAFIA

- Barnet, J.A., R.W. Payne y D. Yarrow, 1979. *A Guide to Identifying and Classifying Yeasts*. Cambridge Univ. Press Cambridge, 315 pp.
- Borlaug, N.E. 1974. *La producción de alimentos a nivel mundial para el futuro*. CIMMYT, México, 8 pp.
- Burrows, S., 1970. Baker's Yeast. En Rose, H. A. y J. S. Harrison (ed.) *The Yeasts. Vol. 3. Yeast Technology*. Academic Press, Nueva York, pp. 365 - 376.
- Calderón, A. y T. Herrera, 1989. Levaduras del pozol blanco y del pozol de mamey de la zona Lacandona de Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 5: en prensa.
- Carbajal de Echevarri, L. 1986. *Monografía sobre la industria de la levadura comprimida para panificación en la República Mexicana*. Sría. de la Economía Nacional, Depto. de Industria, México 53 pp.
- Casillas, L. y A. Vargas, 1984. La alimentación entre los mexicanos. En: *Historia General de la medicina en México*. Fac. de Medicina, UNAM, pp. 133 - 156.
- Clive, R. y C. Thomas, 1987. *Azúcar: Amenaza o desafío?*. CIDD.

Canadá, 147 pp.

Cochran, W. G. y G. W. Cox, 1957. *Experimental Designs*, 2a. ed. Wiley, Nueva York, 289 pp.

Dawson, R. M., C. Daphne, W. Elliot y K.M. Jones, 1969. *Data for Biochemical Research*. Oxford Univ. Press. Oxford, pp. 484 - 497.

Díaz-Garcés, J. , V. Díaz-Garcés, M. Ulloa y J. Taboada. 1988. Determinación de algunos parámetros en la producción doméstica de tибicos. *Rev. lat. amer. Microbiol.* 90: 143 - 146 pp.

Escudero, J. C., F. Morante y O. Isunza, 1984. Proyecciones de las necesidades nutricionales y de alimentación en México. *Div. Nut. Inst. Nal. de Nut.* 66: 1 - 57 pp.

Estrada-Cuellar, L., 1985. *Estudio de las levaduras de los tибicos y de la madre del vinagre*. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, UNAM, 47 pp.

Figueroa, R.R., 1960. *Diseño de una planta piloto para la producción de levaduras alimenticias por fermentación continua*. Tesis Profesional. Esc. Nal. de Ciencias Químicas, UNAM, 150 pp.

- Frazier, W. C. , 1958. *Food Microbiology*. Mc Graw Hill,
Nueva York, pp. 24 - 48.
- Frobisher, M. ,1942. *Fundamentals of Bacteriology*. W. B.
Saunders, Londres pp. 110 - 115.
- Giral, J., 1940. *Fermentos*. Fondo de Cultura Económica,
México, pp. 23 - 28.
- Gunsalus, I. y R. Stalner, 1961. *The Bacteria*. Vol. II.
Metabolism. Academic Press. Nueva York, 572 pp.
- Hawker, L. E. y A. H. Linton, 1979. *Micro-organisms*. Edward
Arnold ed. Londres, pp. 361 - 370.
- Hehre, E. J. , 1951. The biological synthesis of dextrans
from dextrins. En: Steinkraus, K. H. (ed). *Handbook of
Indigenous Fermented Foods*. Microbiology Series, Vol 9.
Marcel Dekker Nueva York, pp. 414 - 420.
- Hernández, M. 1983. *Valor nutritivo de los alimentos
mexicanos*. Instituto Nal. de la nutrición, México, 19 pp.
- Herrera, T. , Salinas Ch. C. y S. Palacios-Mayorga, 1984.
Estudio de cepas de *Klebsiella oxytoca* (Flügge)
Lautropp, fijadoras de nitrógeno, aisladas de las

zoogreas llamadas tибicos. *Rev. lat. amer. Microbiol.* 27:
253 - 257.

Herrera, T. y A. Calderón, 1989. Especies de levaduras
aisladas en México del hongo del té. *Rev. Mex. Mic.* 5: en
prensa.

Hesseltine, C. W, 1965. A millenium of fungi, food and
fermentation. *Micologia* 57: 149 - 197.

Hestrin, S. y M. Schramm, 1954. Synthesis of cellulose by
Acetobacter xylinum. II. Preparation of freeze-dried
cells capable of polymerizing glucose to cellulose. En:
Steinkraus, K. H. (ed). *Handbook of Indigenous Fermented
Foods*. Microbiology Series Vol. 9, Marcel Dekker Inc.
Nueva York, pp. 414 - 420.

Hibbert, H. y J. Barsha, 1931. Studies on reactions relating
to carbohydrates and polysaccharides. XXXIX. Structure of
the cellulose synthesized by the action of *Acetobacter
xylinum* on glucose. En: Steinkraus K.H. (ed). *Handbook of
Indigenous Fermented Foods*, Microbiology Series, Vol. 9,
Marcel Dekker, Nueva York, pp. 141 - 420.

Hicks, Ch. R, 1973. *Fundamental Concepts in the Disign of
Experiments*, 2a. ed. Holt, Rinehart y Winston, Nueva
York, 315 pp.

- Horisberger, M, 1969. Structure of the dextran of the tibi grains. *Carbohydr. Res.* 10: 379 - 385.
- Kozaki, M., A. Koizuri y K. Kitahara, 1972. Microorganisms of zooglear mats formed in tea decoction. En: Steinkraus, K. H. (ed). *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* Microbiology series., Vol. 9. Marcel Dekker, Nueva york, pp. 414 - 420.
- Kreger van Rij, J. J. W. (ed), 1984. *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3a ed. Elsevier, Amsterdam, 1082 pp.
- Lappe O., P. 1988, *Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara.* Tesis Doctoral, Fac. de Ciencias, UNAM, 161 pp.
- Lehninger, A. 1983, *Bioquímica.* 2a ed. Omega, Barcelona, pp. 427 - 435.
- Lodder, J. 1970, *The yeasts. A Taxonomic Study.* North Holland, Amsterdam, 1385 pp.
- Lutz, M. L., 1898. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 5: 1124 - 1126.
- Lutz, M. L., 1899. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. *Bull. Trim. Soc. Mycol. Fr.* 15: 68.

- Lutz, M. L., 1899. Nouvelle recherches sur le tibi. *Bull Trim. Soc. Mycol. Fr.* 15: 157.
- Mascott y Terrés, M, 1952. *Contribución al conocimiento de las levaduras de los tíbicos del arroz.* Tesis Profesional, Fac. de Ciencias, UNAM, 60 pp.
- Medina, M. P., 1985. *Estudio de algunos aspectos bioquímicos de la fermentación que produce pozol.* Tesis Profesional, Fac. de Química, Univ. La Salle, México, 80 pp.
- Mendoza, J. M. 1953, The culture of nata de coco. En: Steinkraus K. H. (ed). *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* Microbiology series, Vol. 9, Marcel Dekker, Nueva York, pp. 414 - 420.
- Meyer, S. A., D. G. Ahearn y D. Yarrow, 1984. *Candida Berkhout.* En: Kreger - van Rij, N. J. W. (ed.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 3a ed., Elsevier, Amsterdam pp. 585 - 844.
- Molinas, M., M. Horisberger y H. Bauer, 1980. The structural organization of the tibi grain as revealed by light scanning and transmission microscopy. *Arch. Microbiol.* 128: 157 - 161.

Montgomery, D. C., 1976. *Design and Analysis of Experiments*.

John Wiley, Nueva York, 520 pp.

Moreno y Díaz, M. P. , 1932. *Contribución al estudio bacteriológico y al análisis químico del vinagre que produce el tífico*. Tesis Profesional, Esc. Nal. de ciencia Químicas, UNAM, 36 pp.

Nolazco, P. y C. Zamora, 1977. La dieta básica para el consumo nacional. En Navarrete, I. M., I. Restrepo y C. Zamora (compiladores). *Alimentación básica y desarrollo agroindustrial*. Fondo de Cultura Económica, México, 420 pp.

Ornelas, C. M., 1945. *Proyecto de una fábrica de levaduras alimenticias*. Tesis profesional, Esc. Nal. de Ciencias Químicas, UNAM, 109 pp.

Paturav, J. M., 1982. *By-products of the Cane Sugar Industry*. Elsevier, Amsterdam, 167 pp.

Pelczar, M. J. y D. R. Reid, 1958. *Microbiology*. 2a. ed. McGraw Hill Nueva York, pp. 79 - 166.

Phaff, H. J., M. W. Miller y E. M. Mrak, 1978. *The life of Yeasts*. 2a. ed. Harvard Univ. Press, Harvard, Inglaterra, 315 pp.

Potter, N. , 1973. *La ciencia de los alimentos*. Edutex, México, 749 pp.

Pidoux, M. , J. M. Brillouet y B. Quemener, 1988. Characterization of the polysaccharides from *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. *Biotechnol. Lett.* 10, No. 6, pp. 415 - 420.

Ramos, M. A. , 1977. Production of Philippine nata from coconut water. En: Steinkraus K. H. (ed). *Handbook of Indigenous fermented Foods*. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Nueva York, pp. 414 - 420.

Ramos, G. R., 1980. *Alimentación normal en niños y adolescentes*. El Manual Moderno, México, 785 pp.

Rose, A. H. 1982. Fermented Foods. En: *Economic Microbiology*, Vol. 7. Academic Press, Nueva York, pp. 7 - 14.

Ruiz-Oronoz, M. 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente con el nombre de tibicos. *An. Inst. Biol., Univ. Nat. Autón. México* 3: 183 - 190.

Secretaría de Programación y Presupuesto, 1982. Sistema Alimentario Mexicano. En: *Legislación y Documentos*

Básicos. Dirección General de Documentación y Análisis de la Sría. Prog. Pres. México , 515 pp.

Serrano, L. L., 1986. *Los tибicos, su cultivo y su utilización potencial*. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, UNAM. 49 pp.

Taboada, J., M. Ulloa, L. Estrada-Cuéllar y J. Díaz-Garcés. 1987. Estudio de las levaduras de los tибicos y pruebas de alimentación con aves y roedores utilizando estas zoogreas en la dieta. *Rev. lat. amer. Microbiol.* 29: 73 - 83.

Ulloa, M., Díaz-Garcés, L. Estrada-Cuéllar y J. Taboada, 1987. Estudio de las levaduras de la madre del vinagre y pruebas de alimentación con aves y conejos utilizando esta nata en la dieta. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 245 - 252.

Ulloa, M., y T. Herrera, 1981. Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen parte de las zoogreas llamadas tибicos en México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 16: 63 - 75.

Ulloa, M., T. Herrera y P. Lappe, 1987. *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. Instituto Nacional

Indigenista, Serie de Investigaciones Sociales No. 16, México, 77 pp.

Underkofler, L. y R. J. Hickey, 1954. *Industrial Fermentations*. Chem. Pub. Vol. I, Nueva York, pp. 70 - 75.

van der Walt, J. P. y D. Yarrow, 1984. Methods for the Isolation, Maintenance, Classification and Identification of yeasts. En: Kreger-van Rij, N. J. W., (ed.), *The Yeasts. A Taxonomic Study.*, 3a. ed. Elsevier, Amsterdam pp. 45 - 104.

Vargas, L. A., 1985. Old and new transitions and nutrition in Mexico. *Memorias del 98th Simposium The Health and Disease of Populations in Transition*. Santa Fé, Nuevo México, 30 pp.

Ventosa, R.J., 1947. *La alimentación popular*. SEP, México, 252 pp.