

T
518

90886

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**"DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,
BIOQUÍMICAS, FISICOQUÍMICAS Y SENSORIALES PARA LA
ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE TEPACHE"**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Rubén Darío Moreno Terrazas Casildo

Comité tutorial:

Tutor:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Asesores:

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA

DRA. PATRICIA LAPPE OLIVERAS

Enero 2005.



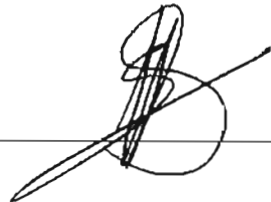
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Rubén Darío Moreno Terrazas Casildo

El día 27 de Enero de 2005.

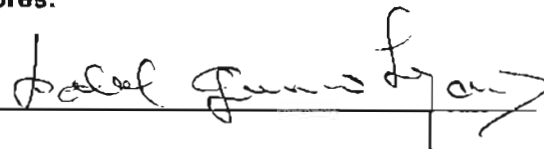
Tutor:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

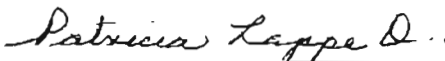


Asesoras:

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA



DRA. PATRICIA LAPPE OLIVERAS




Sinodales:

DRA. MERCEDES GUADALUPE LÓPEZ PÉREZ



DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA



DEDICATORIA

A mi esposa Rosalía y a mis hijos León y Emiliano que los quiero con todo mi corazón

A mi Papá por que siempre me impulsó a seguir en este camino del estudio y que no pudo verme terminar este trabajo

A mi Mamá que con su amor y apoyo incondicional siempre ha estado junto de mí

A mi hermano Oscar que también le hubiera gustado estar en este momento

A mis otros hermanos Cuauhtémoc y Tonatiuh que me enseñaron el camino a seguir

A Rosita porque siempre está dispuesta a ayudar sin ninguna condición

A mis amigos Manuel, Gilberto y Mardo que siempre están para cuando se les necesita

A mis amigos y compañeros de la Universidad iberoamericana Ruth, Dora, Héctor, Eduardo, Mayela, Judith y Arturo por que siempre están para hacerme fuerte y apoyarme de distintas maneras

A mis primas Verónica y Lourdes y a mi Tía Mago por su cariño

A todos aquellos compañeros, amigos o familiares que de una u otra manera hicieron posible este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios otorgada para la realización de esta tesis

A la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa

A la Universidad Iberoamericana

Al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

Por las facilidades otorgadas para el uso de sus equipos e instalaciones.

Al M. en C. Héctor Cejudo Gómez, Al Ing. Santiago Martínez Hernández y a la M. en C. Andrea Silva Beard, y en especial a la Universidad Iberoamericana por darme oportunidad de iniciar, continuar y concluir los estudios de doctorado

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa por el apoyo brindado y la paciencia para la dirección de esta tesis

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras por estar siempre al pendiente del desarrollo de este trabajo, por darme la oportunidad de tener un mejor desarrollo profesional y sobre todo por su amistad

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta por el apoyo, la confianza y libertad para la realización de este trabajo, así como orientarme para poder realizar el trabajo experimental en diferentes instituciones

Al Dr. Jaime Vernon Carter por convencerme de realizar estos estudios, su asesoría, su experiencia y asertividad para escribir e interpretar datos experimentales, su apoyo como asesor mientras lo fue y su ayuda desinteresada cuando dejó de serlo

A la Dra. Mercedes G. López por su apoyo, consejos prácticos para la determinación de compuestos volátiles y participación como sinodal

A la Dra. Edith Ponce Alquicira por su participación como sinodal y reconocimiento al trabajo

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez por el apoyo y facilidades para realizar las secuenciaciones de levaduras y por poder realizar estancias de investigación en su laboratorio

Al Dr. Miguel Ulloa Sosa por las facilidades y apoyo para trabajar en su laboratorio y por permitir que la Dra. Lappe siempre me pudiera ayudar

A la M. en C. Elvira Aguirre Acosta por su recomendación y confianza para poder realizar parte de este trabajo en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la UNAM

En especial al Técnico Arturo Alpízar Ramírez ya que sin él, este trabajo no hubiera sido posible

A la maestra Mayela de la Rosa Miranda por toda la disposición que tuvo para apoyarme en la evaluación sensorial de este trabajo así como en otras muchas fases

A todo el grupo de jueces entrenados por su valiosa participación a lo largo de la evaluación sensorial del tepache:

Dra. Margarita Nava Luja

M. en C. Eduardo Arias Baez

M. en C. Mayela de la Rosa Miranda

Sria. Judith Rivera Bolaños

Sria. Elizabeth Martínez Fuentes

Sria. Beatriz Camargo Martínez

Q. F. B. Hermila Reyes Morales

M. en C. Héctor Cejudo Gómez

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 CARACTERÍSTICAS DEL TEPACHE	2
II.1.1 Definición, origen y tradición	2
II.1.2 Forma de preparación	3
II.2 MICROORGANISMOS PRESENTES EN TEPACHE DE FRUTAS, TEPACHE DE TIBICOS Y TIBICOS	3
II.2.1 Características de los microorganismos del tepache y de los tibicos del tepache	3
II.2.2 Definición actual de los tibicos	4
II.2.3 Origen de los tibicos	5
II.2.4 Otros microorganismos presentes en los tibicos	5
II.2.5 Levaduras asociadas a frutos involucrados en la elaboración del tepache	7
II.3 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	8
II.3.1 Criterios de clasificación de microorganismos	8
II.3.2 Identificación molecular de levaduras	9
II.3.3 Iniciadores recomendados para la identificación de levaduras	12
II.4 PROCESOS BIOQUÍMICOS PARA PRODUCIR ALCOHOL Y SUSTANCIAS QUE DAN AROMAS EN PRODUCTOS FERMENTADOS Y EN FRUTAS	13
II.4.1 Sabores y aromas presentes en productos fermentados	13
II.4.2 Sabores y aromas asociados a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
II.4.3 Sabores y aromas en piña	16
II.5 EVALUACIÓN SENSORIAL	17
II.5.1 Pruebas con consumidores	17
II.5.2 Desarrollo de perfil sensorial	18

II.5.3 Análisis cuantitativo descriptivo	20
III. JUSTIFICACION	22
IV. HIPÓTESIS	24
IV.1 HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	24
IV.2 HIPÓTESIS NULA	24
IV.3 HIPÓTESIS ALTERNATIVA	24
V. OBJETIVOS	25
V.1 OBJETIVO GENERAL	25
V.1.1 Objetivos particulares	25
VI. METODOLOGÍA	26
VI.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	26
VI.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	27
VI.2.1 Cuantificación, aislamiento e identificación tradicional de microorganismos	27
VI.2.1.1 Bacterias lácticas y acéticas	28
VI.2.1.2 Bacterias mesófilas aerobias	30
VI.2.1.3 Bacterias coliformes y <i>Enterobacteriaceae</i>	31
VI.2.1.4 Levaduras y hongos	31
VI.2.2 Secuenciación del dominio D1/D2 del gene 26S del ADN de levaduras seleccionadas	36
VI.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISICOQUÍMICA	39
VI.3.1 Determinaciones de ácidos láctico y acético, de etanol, de proteína cruda, de pH, de acidez titulable y °Brix	39
VI.3.2 Extracción de compuestos volátiles	40
VI.3.3 Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	41
VI.4 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL TEPACHE	41
VI.4.1 Principales atributos sensoriales del tepache percibidos por consumidores	41
VI.4.1.1 Selección de consumidores	41
VI.4.1.2 Evaluaciones	42

VI.4.1.3 Tratamiento estadístico de pruebas con consumidores	43
VI.4.2 Desarrollo de descriptores con jueces entrenados	43
VI.4.2.1 Adiestramiento específico de jueces entrenados	43
VI.4.2.2 Generación de descriptores	44
VI.4.2.3 Validación de descriptores	46
VI.4.3 Análisis cuantitativo descriptivo (ACD)	46
VI.4.3.1 Análisis estadístico ACD	47
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
VII.1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	48
VII.1.1 Cuantificación de microorganismos	48
VII.1.2 Identificación de microorganismos	50
VII.1.2.1 Bacterias lácticas	50
VII.1.2.2 Bacterias acéticas	52
VII.1.2.3 <i>Enterobacteriaceae</i>	53
VII.1.2.4 Levaduras	53
VII.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y FÍSICOQUÍMICAS	60
VII.2.1 Determinaciones de ácidos láctico y acético, de etanol, de proteína cruda, de pH, de acidez titulable y de °Brix	60
VII.2.2 Identificación de compuestos volátiles	63
VII.2.2.1 Alcoholes	66
VII.2.2.2 Ácidos grasos	69
VII.2.2.3 Ésteres	71
VII.2.2.4 Alcanos	73
VII.2.2.5 Fenoles	74
VII.2.2.6 Furanos	76
VII.2.2.7 Terpenos	77
VII.2.2.8 Lactonas	77
VII.2.2.9 Derivados de aminoácidos	78
VII.3 EVALUACIÓN SENSORIAL	79
VII.3.1 Principales atributos sensoriales del tepache percibidos por consumidores	79

VII.3.1.1 Cuestionario filtro	79
VII.3.1.2 Prueba monádica secuencial de aceptación con consumidores	81
VII.3.1.3 Prueba secuencial comparada de muestras con consumidores	84
VII.3.1.4 Relación de género y frecuencia de consumo con la aceptación global monádica en pruebas con consumidores	86
VII.3.2 Generación de descriptores	87
VII.3.3 Entrenamiento de los jueces	94
VII.3.4 Análisis cuantitativo descriptivo	98
VII.4 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO	104
VIII. CONCLUSIONES	110
IX. PERSPECTIVAS	113
X. BIBLIOGRAFÍA	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de reactivos necesarios en la mezcla maestra	35
Tabla 2. Mezcla utilizada para la reacción de marcaje	37
Tabla 3. Cuenta total de microorganismos aislados de muestras de tepache obtenidas dos y tres pasos de fermentación log ufc/ml	49
Tabla 4. Microorganismos aislados de diferentes muestras de tepache	51
Tabla 5. Diferencias morfo-fisiológicas y bioquímicas presentadas por aislados de <i>S. cerevisiae</i>	56
Tabla 6. Diferencias morfo-fisiológicas y bioquímicas presentadas por los aislados de especies de <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i>	59
Tabla 7. Determinaciones fisicoquímicas y bioquímicas de muestras de tepache	61
Tabla 8. Determinación de compuestos volátiles en diferentes muestras de tepache	64, 65
Tabla 9. Prueba comparativa secuencial de tepaches comerciales con consumidores para diferentes atributos sensoriales	85

Tabla 10. Factores de carga de componentes principales para descriptores de apariencia de tepache	88
Tabla 11. Factores de carga de componentes principales para descriptores de olor de tepache	90
Tabla 12. Factores de carga de componentes principales para descriptores de sabor-aroma de tepache	91
Tabla 13. Factores de carga de componentes principales para descriptores de sabor residual de tepache	93
Tabla 14. Descriptores finales de tepache	94
Tabla 15. Vocabulario para descriptores de tepache utilizado en el análisis cuantitativo descriptivo de muestras comerciales	95
Tabla 16. Referencias utilizadas para los descriptores de tepache	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración comercial de tepache de las muestras A, B, C y D según productores	26
Figura 2. Cromatograma típico de compuestos volátiles de una muestra de tepache de 60 h de fermentación.	63
Figura 3. Cantidad relativa de compuestos volátiles que aparecen en muestras de tepache	68
Figura 4. Porcentaje de compuestos volátiles presentes en muestras de tepache	69
Figura 5. Cantidad relativa de compuestos volátiles más abundantes en muestras de tepache para cada bebida	72
Figura 6. Porcentaje de grupos de compuestos volátiles presentes en muestras de tepache	74
Figura 7. Cantidad relativa de grupos de compuestos volátiles que aparecen en muestras de tepache	75
Figura 8. Cantidad relativa de grupos de compuestos volátiles que aparecen en cada bebida	79
Figura 9. Frecuencia etárea de consumidores de tepache	80
Figura 10. Frecuencia de consumo de tepache	81
Figura 11. Evaluación monádica de atributos en diferentes muestras de tepache	82

Figura 12. Ubicación de las muestras de tepache con relación a la importancia de distintos atributos evaluados por consumidores	83
Figura 13. Relación de género con la aceptación global de consumidores	86
Figura 14. Relación de frecuencia de consumo con la aceptación global de consumidores	87
Figura 15. Perfil descriptivo de apariencia en muestras de tepache	99
Figura 16. Perfil descriptivo de olor en muestras de tepache	100
Figura 17. Perfil descriptivo de sabor-aroma en muestras de tepache	101
Figura 18. Perfil descriptivo de sabor residual en muestras de tepache	102

RESUMEN

El tepache es una bebida fermentada tradicional mexicana que se vende de manera artesanal en diversos lugares a lo largo de la mayor parte del territorio nacional, es una bebida que se elabora con frutas, principalmente con piña. Existen pocos estudios que permitan saber acerca de las características de esta bebida, y sólo hay referencias acerca del aislamiento de levaduras del producto de venta. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales como base para estandarizar el proceso de elaboración de tepache.

Inicialmente se realizó una encuesta en 4 establecimientos localizados en el norte de la Ciudad de México en donde se prepara el tepache de manera artesanal, con el fin de determinar de forma precisa el proceso de elaboración de la bebida y así tener las bases para la estandarización del proceso. Se observaron dos procesos de elaboración de la bebida, uno con tres pasos de elaboración (A y B) y otro con dos (C y D). De las muestras A y D los productores permitieron llevar a cabo el muestreo a las 48 h y 60 h y de las otras dos sólo a las 60 h. Se realizaron cuentas de los principales grupos de microorganismos presentes en el tepache, así como la identificación morfo-fisiológica de los microorganismos más abundantes. En aquellos aislados de levaduras que tuvieron problemas en su identificación esta se corroboró mediante la secuenciación del dominio D1/D2 del ADN_r y las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con las depositadas en el GenBank. Se determinó la presencia de ácidos láctico y acético y etanol y compuestos volátiles mediante cromatografías de líquidos (HPLC) y de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se realizó también una evaluación sensorial con consumidores, se desarrollaron descriptores, se validaron y se llevó a cabo un análisis cuantitativo descriptivo de la bebida con un grupo de jueces entrenados. Se observó que los grupos más abundantes fueron las bacterias lácticas, las bacterias acéticas y las levaduras, encontrándose todos estos grupos en niveles mayores a 10^6 ufc/ml en producto de venta y en niveles mayores a 10^7 ufc/ml en las muestras de fermentación intermedia. Los microorganismos presentes en todas las muestras fueron diferentes variedades de *Leuconostoc mesenteroides*, especies de *Lactobacillus*, bacterias acéticas del género *Acetobacter*, la enterobacteria *E. aerogenes*, *Saccharomyces cerevisiae*, especies de *Hanseniaspora/Kloeckera* y especies de *Candida*. El resto de los parámetros determinados se realizaron en muestras de 60 h de fermentación. En promedio, el etanol se encontró en cantidades menores al 1%, el ácido láctico fue menor al 0.4% y el acético menor a 0.04%. Los compuestos volátiles que se encontraron en mayor proporción fueron: ácidos orgánicos, alcoholes, furanos, terpenos, cetonas, ésteres, derivados de aminoácidos, fenoles y lactonas, siendo los más abundantes el fenil etil alcohol, seguido del butanol-3-metil y el (+)- α -terpineol. En el estudio sensorial se observó que la bebida es aceptada por un grupo muy amplio de la población con una gran variación etárea. Más del 55% de los consumidores entrevistados consume actualmente la bebida cuando menos una vez cada 15 días. Se encontró una alta correlación entre los atributos de apariencia, olor, sabor, primera impresión y gusto global. La intensidad del sabor resultó

significativamente diferente en muestras pareadas. Con los jueces entrenados se desarrollaron 32 descriptores de la bebida que fueron divididos en descriptores de los atributos de apariencia, olor, sabor-aroma y sabor residual. Finalmente como resultado del análisis cuantitativo descriptivo se detectaron diferencias en la mayor parte de los descriptores de apariencia, sabor-aroma y sabor residual, no así en los de olor donde solo el olor a fermentado, a piña fermentada y picante corroboraron lo que describieron la apariencia, el aroma-sabor y el sabor residual donde se encontró que se podían agrupar a las cuatro bebidas en dos grupos que coincidieron con la forma en la que se elaboraba el producto, siendo, bebidas con mayor o menor grado de fermentación. Con la información obtenida con los productores y los resultados de este estudio se conocen la mayor parte de los parámetros necesarios para elaborar la bebida de forma controlada con los atributos de calidad que permitan obtener un producto que tenga siempre características similares.

I. INTRODUCCIÓN

Es de gran importancia establecer como se lleva a cabo el proceso fermentativo tradicional del tepache ya que permite conocer las características más importantes de la forma de producción de esta bebida refrescante que se ha elaborado desde la época prehispánica y que se sigue produciendo en México. Esta bebida que inicialmente se hacía de maíz es elaborada actualmente de frutas, principalmente de desperdicio del consumo de la piña. Debido a que el tepache aún permanece en el gusto popular, y que es factible estandarizar su proceso, surge la posibilidad de conocer sus características y además darle un valor agregado a los subproductos que se presentan en la industrialización de esta fruta, principalmente la que se destina a la elaboración de piña en almíbar, por tener un mayor porcentaje de subproducto como la cáscara, parte de la pulpa y el corazón.

Por otro lado el tepache puede elaborarse utilizando como inóculo levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas que imparten ciertas características de sabor a la bebida, y así obtener un producto con características constantes, con los atributos más importantes que tienen las bebidas artesanales que se venden en diferentes establecimientos.

Este trabajo permitirá conocer las características sensoriales, bioquímicas, fisicoquímicas más importantes que se generan en la bebida denominada tepache. Así como establecer los microorganismos involucrados en el desarrollo de esas características. Una vez que se conozcan los microorganismos presentes en la bebida que se elabora a nivel comercial y las características que tienen diferentes muestras, se seleccionaran aquellos microorganismos que influyan en las características más importantes de la bebida y que puedan ser utilizados como inóculo en una fermentación controlada.

II. ANTECEDENTES

II.1 CARACTERÍSTICAS DEL TEPACHE

II.1.1 Definición, origen y tradición

El tepache es una bebida fermentada, refrescante, de consumo general en México. Por su etimología la palabra tepache significa bebida de maíz (del náhuatl **tepiatl**). Se cree que el nombre puede provenir del náhuatl **tepiatzin** (de **tépitl** variedad de maíz y **atl** agua o bebida) o bien del náhuatl **tepachoa** que significa moler o prensar algo con una piedra (Ulloa y Herrera, 1982). Pese a que esta bebida es muy conocida en México desde tiempos prehispánicos, parece no haber datos fidedignos acerca de su origen, y tan sólo se le atribuye semejanza por su origen, a la chicha de Perú (Ulloa y Herrera, 1982).

En la actualidad, el tepache se prepara generalmente por fermentación de pulpa de diversos frutos, aunque entre algunas comunidades indígenas, como los Amuzgos de Oaxaca, Guerrero, Puebla y Veracruz; los Pápagos de Sonora y los Triques de Oaxaca, aún persiste la costumbre de elaborarlo con maíz. Si bien existe poca información acerca de como elaborar el tepache de frutas existe menos información sobre su similar de maíz, incluso se desconoce hasta la forma detallada de prepararlo. Este tepache de maíz es utilizado diariamente entre comidas por algunos indígenas, o en fiestas religiosas (Cruz y Ulloa, 1973).

Para los chinantecos de Valle Nacional el tepache o "fang choo" es una bebida que se elabora con maíz criollo tostado en comal de barro el que ponen en una olla con rajas asadas de caña de azúcar, la cáscara de dos piñas maduras y piloncillo; se cierra herméticamente la olla y se deja reposar durante ocho días para que logre una buena fermentación. Se consume en reuniones familiares como bebida refrescante, aunque en exceso embriaga (Nieto y Vázquez, 1993).

También los totonacas consumen tepache de piña elaborado a partir de piña y jugo de caña de azúcar y tal vez originalmente utilizaban jugo de caña de maíz o miel (Bruman, 2000).

II.1.2 Forma de preparación del tepache

Aunque hay diversas maneras de preparar tepache, la más frecuente es aquella en la que se obtiene no de maíz, como se ha mencionado, sino con frutas como piña, manzana, naranja, guayaba y otras, las cuales son puestas a fermentar, durante un tiempo variable en barriles de madera, llamados tepacheras, en agua endulzada con piloncillo. Las tepacheras son tapadas con tela de manta de cielo u otro dispositivo con el fin de evitar la introducción de moscas del género *Drosophila* o cualquier otro tipo de contaminación.

Después de uno o varios días se obtiene una bebida refrescante de sabor dulce y agradable, pero si la fermentación se prolonga demasiado tiempo, se vuelve una bebida embriagante no apta para el consumo, que adquiere posteriormente un sabor agrio acre desagradable, debido a la formación de ácido acético. En raras ocasiones, el tepache también puede ser preparado con el jugo de caña de azúcar o con pulque (Santamaría, 1942, 1959; Ulloa y Herrera, 1982; Ulloa y col., 1987).

II.2 MICROORGANISMOS PRESENTES EN TEPACHE DE FRUTAS, TEPACHE DE TIBICOS Y TIBICOS

II.2.1 Características de los microorganismos del tepache y de los tibicos del tepache

El primer estudio microbiológico del tepache trata del aislamiento e identificación de *Torulopsis inconspicua* (= *Candida inconspicua*) y de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de una muestra obtenida en una tepachería en México, D. F. (Nava-Garduño, 1953). Herrera y Ulloa (1978) a partir de muestras

de tepache obtenidas de las ciudades de Queretaro, Qro. y México, D. F. aislaron *Candida queretana* (= *C. boidinii*), *Pichia membranaefaciens* (= *P. membranifaciens*) y *S. cerevisiae*.

Ruiz Oronoz (1932) y Mascott y Terrés (1952) sólo enfocaron su atención al aislamiento de microorganismos de los tibicos que suelen ser usados como inóculo en la preparación de tepache de tibicos. Es oportuno hacer notar que Mascott y Terrés, en su trabajo sobre levaduras de los tibicos, se refieren a éstos como los tibicos del arroz, no porque hayan sido obtenidos a partir de arroz sino debido a que a simple vista aparecen como masas blanquecinas translúcidas y de consistencia gelatinosa, semejantes a los granos de arroz cocido, aunque mucho más compactas y, además con vetas muy finas que las atraviesan irregularmente. Supuestamente los tibicos se forman en el tepache de piña cuando éste es dejado a la intemperie, porque después de que aparece en la superficie una nata blanca, esta se sedimenta en el fondo donde se forman las masas blanquecinas mencionadas. Ambos autores señalan que los microorganismos embebidos en los tibicos se reproducen activamente en agua con piloncillo.

II.2.2 Definición actual de los tibicos

Los tibicos son microbiogreas o macrocolonias compuestas principalmente por bacterias y levaduras que constituyen una asociación simbiótica muy estable, semejantes a masas gelatinosas compactas de color blanquecino o amarillento, translúcidas u opalescentes, de forma irregular y de tamaño variable (Horisberger, 1969; Ulloa y Herrera, 1981; Rubio y col., 1993).

Los tibicos están constituidos por una matriz de polisacáridos, generalmente dextranas, dispuestos en dos capas. La externa es compacta y en ella se encuentran embebidas bacterias y levaduras, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO₂ producido durante la fermentación (Moinas y col., 1980).

II.2.3 Origen de los tibicos

El origen de los tibicos es aún incierto pero se cree que son originarios de México y que se forman en los frutos de diversas especies de *Opuntia*, como masas globosas muy semejante a granos de arroz cocido como las denominan Mascott y Terrés (Lutz, 1899a, b; Ruiz Oronoz, 1932). Se ha observado también, que estas microbiogleas se desarrollan en sustratos azucarados o jugos de diversas frutas, por lo que se considera que los constituyentes microbianos de dichas biogleas pueden variar de acuerdo al sustrato en el que se desarrollen.

Los tibicos se han utilizado popularmente en México desde la época anterior a los españoles, para producir bebidas refrescantes de bajo contenido alcohólico y acético cuando el tiempo de fermentación es corto (2-3 días), como el colonche de jugo de tuna y el tepache de jugo de diversas frutas, o de piloncillo), pero si la fermentación se prolonga por más tiempo (2 a 3 semanas) se produce el vinagre de tibicos (Ulloa y col., 1987). En Europa los tibicos también son empleados para elaborar bebidas fermentadas ácidas, ligeramente alcohólicas, conocidas como “kefir” dulce o la cerveza de jengibre (Hesseltine, 1965; Pidiux y col., 1989)

II.2.4 Otros microorganismos presentes en los tibicos

Como se ha mencionado anteriormente, existen diversos organismos que forman parte de estas microbiogleas. Desde el siglo pasado se han identificado principalmente a levaduras y a bacterias. Lutz (1898, 1899a, b) identificó a la levadura *Sacharomyces radaisii* y a la bacteria *Bacillus mexicanus*.

En 1932, Ruiz Oronoz aisló e identificó la levadura *Pichia radaisii* y consideró a *S. radaisii* como sinónimo de ésta. Sin embargo, en la actualidad la identidad de esta levadura permanece incierta porque el aislamiento se perdió.

Moreno y Díaz (1932) expuso en su trabajo una somera descripción de la microbiología y análisis químico del vinagre de los tibicos, haciendo una descripción de bacterias y citó las siguientes especies: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* y *B. graveolens* (posible sinónimo de *B. megaterium*)

En 1952, Mascott y Terrés aislaron las levaduras *Saccharomyces bayanus* y *S. oviformis*, ambas sinónimos de *S. cerevisiae*, y *Pichia chodatii* var. *trumpy*, (= *P. membranifaciens*). Estas levaduras también fueron encontradas por Ulloa y Herrera (1981) en tres muestras de tibicos.

En 1985, Estrada-Cuellar registró a *Brettanomyces intermedius* (= *B. bruxellensis*), y nuevamente a *S. cerevisiae*.

En Europa, el estudio microbiano y químico de los tibicos ha adquirido una gran relevancia. En 1989 Pidiux reportó el aislamiento de las levaduras: *Zygosaccharomyces florentinus*, *Torulaspora pretoriensis*, *Candida valida*, *C. lambica* y *Kloeckera apiculata*, y de las bacterias *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rharnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* *Streptococcus lactis* (= *Lactococcus* var. *lactis*) y *Streptococcus cremoris* (= *Lactococcus lactis* var. *cremoris*).

En 1993, Rubio y col. llevaron a cabo un estudio químico y microbiano de dos fermentaciones de tepache realizadas con granos de tibicos. El medio de cultivo fue agua endulzada con piloncillo y se determinó la sucesión microbiana durante el proceso de fermentación. Inicialmente, se encontraron bacterias lácticas homo y hetero-fermentativas, seguida por especies del género *Bacillus*: *B. brevis* (= *Brevibacillus brevis*), *B. circulans*, *B. firmus*, *B. macerans* (= *Paenibacillus macerans*), *B. polymyxa* (= *Paenibacillus polymyxa*) y *B. pumilus*, así como *Enterobacter aerogenes*. También se identificaron las levaduras *Brettanomyces clausenii* (= *B. anomalus*), *Candida guilliermondii*, *C. valida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* (= *R. mucilaginosa*) y *S. cerevisiae*.

II.2.5 Levaduras asociadas a frutos involucrados en la elaboración de tepache

Muchas de las levaduras conocidas se han aislado de plantas, de suelos, de sustratos azucarados y se sabe que pueden estar asociadas a algunas plantas. Pocos estudios se han realizado sobre plantas tropicales, en particular, en Brasil se han realizado algunos con diferentes frutas, reconociendo el tipo de levaduras que forman parte de la micobiota natural en diversas partes de la planta.

Por ejemplo, en piña se realizó un estudio donde se observó que en el fruto maduro o cercano a la madurez tenía de 3.2 a 7.3×10^5 ufc de levaduras por gramo en la superficie del fruto, y de 22.2 a 8.6×10^2 ufc de levaduras por gramo de pulpa. Siendo *C. guilliermondii* la especie dominante en los frutos maduros analizados y especies de *Cryptococcus* y *Rhodotorula* en aquellos no maduros. También observaron que *Hanseniospora guilliermondii* fue importante en frutos muy maduros y/o dañados (Robbs y col, 1989).

En 2000 Abranches y col. realizaron una investigación sobre las levaduras presentes en diferentes especies de guayabas procedentes de un área forestal y una rural en Río de Janeiro, Brasil. Encontraron que las especies que más frecuentemente aparecieron fueron: *Kloeckera africana*, *K. apis*, *Pichia kluyveri* y *P. membranifaciens* y especies de *Issatchenkia*, algunas de éstas con actividad micocinogénica. Se observó también que las mayores cuentas de levaduras se obtuvieron en frutos caídos donde había una gran cantidad de insectos rodeando a los frutos, por lo que los autores sugieren que este tipo de frutos pueden ser un hábitat importante de levaduras en ambientes tropicales.

II.3 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

II.3.1 Criterios de clasificación de microorganismos

Tradicionalmente los microorganismos han sido clasificados e identificados principalmente por medio de criterios morfológicos y fisiológicos (por ejemplo: forma de las células, modo de reproducción, temperatura máxima de desarrollo, tolerancia a desarrollarse en diversos compuestos y aprovechamiento o no de diversas sustancias, principalmente carbohidratos y compuestos de nitrógeno). Además de estas pruebas convencionales, los métodos bioquímicos proveen datos importantes para la caracterización de los microorganismos, sin embargo, el resultado de estas pruebas en ocasiones conduce a caracterizaciones erróneas debido a que estas características son controladas por uno o unos cuantos genes. Además como todas estas pruebas requieren de mucho tiempo y en ocasiones su determinación y clasificación resulta ambigua, debido a la variabilidad de las especies.

Actualmente, existe el criterio de complementar las técnicas convencionales, con técnicas moleculares de tipificación génica como secuencia de regiones de genes específicos como 16S y 23S en bacterias y el 18S y 26S y regiones ITS en levaduras así como similitudes o diferencias en otras macromoléculas de las células (ARN, proteínas, polisacáridos y lípidos) para dilucidar no sólo el grado de relación, sino también para revelar conexiones evolutivas entre los organismos (Ludwig y Schleifer, 1994; Kurtzman, 1998).

Como han reportado Vaughan-Martini y col. (2000) muchas veces entre cepas de una misma especie pueden observarse variaciones fisiológicas en la fermentación y asimilación de diversas fuentes de carbono, así como en la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas. Por ello, como un complemento a esta información morfo-fisiológica se hace necesario confirmar la identidad de un microorganismo mediante diversos métodos moleculares de tipificación genética.

II.3.2 Identificación molecular de levaduras

La aplicación de las técnicas moleculares ha reducido sustancialmente el tiempo requerido para la identificación de estos microorganismos y ha optimizado la veracidad de la misma (Kurtzman y Fell, 1998).

Inicialmente la identificación molecular de las levaduras se basó en la similitud existente entre el ADNn de cepas aisladas con su especie tipo. En estudios de reasociación de ADNn con algunas levaduras ascomicetos heterotálicas se ha observado que miembros de una especie biológica determinada, exhiben generalmente 70% o más de complementariedad en su ADNn. Aislamientos con un porcentaje de hibridación de ADNn del 40-70% son a menudo consideradas como variedades o subespecies, a menos que las cruas genéticas arrojen otro tipo de información. Este criterio ha sido aplicado tanto a levaduras homotálicas como a levaduras anamórfas con el argumento de que dentro de este grupo no hay cambios en la relación de ADNn con respecto a los encontrados en especies heterotálicas (Kurtzman, 1987; Kurtzman y Phaff, 1987).

Las principales desventajas de esta técnica fueron que la reasociación de ADNn tenía la necesidad de comparar todos los aislamientos con su par (pairwise) y que tenía una resolución limitada en cuanto a la distancia genética entre especies hermanas. Por tanto los estudios se enfocaron a otras comparaciones moleculares que incluyen la secuenciación de las regiones del ADNr que codifican para las subunidades 5.8S, 18S, 26S e ITS, el polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP) (Bruns y col., 1991) y la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Hadrys y col., 1992). De éstos, la secuenciación parece ser la más adecuada porque la comparación de cepas, es más fácil de hacer y además, con una apropiada selección de genes se pueden resolver relaciones filogenéticas distantes (Kurtzman y Robnett, 1998).

Actualmente la tendencia es usar técnicas combinadas como el RFLP, los ribomodelos y la secuenciación, ya que parece ser que todas ellas dan información complementaria para establecer una ubicación filogenética de levaduras más real. Así lo demuestra el estudio de Kurtzman y col., (2001) donde la combinación de estas técnicas ayudó a distinguir diferentes especies dentro del género *Zygosaccharomyces*, en aislamientos obtenidos del “te Kombucha”.

En estudios anteriores, Peterson y Kurtzman (1991) secuenciaron el dominio variable D2 (ca. 300 nucleótidos) cerca del extremo 5' de la subunidad mayor del gene 26S del ARNr de especies heterotálicas hermanas pertenecientes a 3 géneros (*Issatchenkia*, *Pichia* y *Saccharomyces*), para determinar si especies cercanamente relacionadas podían distinguirse a partir de sustituciones en esta región. Cepas coespecíficas generalmente tuvieron menos de 1% de sustituciones de nucleótidos en este dominio; cuando las sustituciones fueron mayores, se estableció la separación de diferentes especies biológicas, lo anterior proporciona una forma arbitraria para reconocer especies.

Numerosos estudios han presentado la filogenia de diferentes grupos de levaduras a partir de la comparación de secuencias de ADNr y de ARNr pero tienen la limitante que han sido enfocados a géneros individuales, que están circunscritos a un criterio fenotípico, o que han trabajado con especies con relativamente poca divergencia. En ambos casos, la relación está a menudo entendida de manera incompleta porque el número de taxa ha sido pequeño.

Kurtzman y Robnett (1998) analizaron la dimensión de la divergencia con respecto a la variación en el dominio D1/D2 de la subunidad mayor gene 26S del ADN ribosomal de casi 500 especies de levaduras ascomicetos incluyendo a miembros de *Candida* y otros géneros anamórfos. Concluyeron que la divergencia en este dominio era suficiente para resolver sobre especies individuales, determinaron que 55 especies comúnmente reconocidas como taxa eran sinónimos de especies descritas anteriormente. Establecieron también las relaciones filogenéticas entre

levaduras-ascomicetos analizando la divergencia de la secuencia D1/D2, y determinaron que existe una concordancia bastante alta soportada estadísticamente entre los árboles basados en las secuencias D1/D2 y los de los basados en la subunidad 18S cuando se ramifican. Corroboraron también que cuando la sustitución de nucleótidos en el dominio D1/D2 no excede al 1%, se trata de cepas coespecíficas, y que, si hay una mayor divergencia se trata de miembros de diferentes especies, tanto en taxa heterotálicos como algunos homotálicos y anamórfos. Es necesario que aquellas especies que tengan pequeñas diferencias deba de corroborarse la coespecificidad por medio de reasociación o hibridación de ADNn (Kurtzman y Robnett, 1998).

En cuanto a las levaduras basidiomicetos la identificación y posición filogenética no es fácil de establecer, en parte por la naturaleza polifilética del grupo. La separación de estas levaduras en tres clases está basada en su morfología septada, en la composición de su pared celular y en el análisis del ADNr. La diagnosis genérica está basada en su biología sexual y vegetativa, pero al igual que con las levaduras ascomicetos estas características si se usan como criterios en forma aislada, no son adecuados para realizar una buena identificación, debido también a la variabilidad que hay dentro y entre especies.

Por tal motivo, en la identificación de estas levaduras también se han incorporado diferentes métodos moleculares, entre los que se puede mencionar: Iniciadores específicos para determinada especie, análisis polimórfico de fragmentos largos de restricción (RFLP), electroforesis en campos pulsados, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y el polimorfismo conformacional de cadenas simples. Pero en donde ha habido avances más significativos en la sistemática de basidiomicetos es, al igual que con ascomicetos, en el análisis de la secuencia de las subunidades mayor y menor de ADN y ARN ribosomal (Fell y col., 2000).

Fell y col. (2000) han examinado la región D1/D2 de la subunidad mayor del gene 26S ADNr para todas las especies conocidas de levaduras-basidiomicetos, pero

además de esta región han analizado la de los espacios internos de transcripción (ITS) lo que permite reconocer especies relacionadas, con esto han establecido que la mayoría de las especies pueden ser identificadas analizando la región D1/D2, pero que la región ITS es necesaria para distinguir especies estrechamente relacionadas, como es el caso de la especie *Cryptococcus albidus* que ha sido dividida en tres clados (Fonseca y col., 2001).

II.3.3 Iniciadores recomendados para la identificación de levaduras

Con todos estos antecedentes se conocen en la actualidad diferentes iniciadores que facilitan el proceso de amplificación de las regiones del ADN_r secuenciadas. Para ascomicetos existen iniciadores universales externos de la región D1/D2 que son NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG) y NL-4 (5'-GGT GGC TGT TTC AAG ACG G) como avance (forward) y reversa respectivamente, aunque también se recomienda el NLR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC). Como iniciadores internos se utilizan el NL-2 (5'-CTC TCT TTT CAA AGT TCT TTT CAT CT) y el NL-3 (5'-AGA TGA AAA GAA CTT TGA AAA GAG AG). Otros iniciadores de este dominio son el NL-2A (5'-CTT GTT CGC TAT CGG TCT C), NL-3A (5'-GAG ACC GAT AGC GAA CAA G) y NLR3 (5'-AGA TGA AAA GAA CTT TGA AAA GAG AG). De estos iniciadores el NL-4 y el NLR6 aparte de amplificar la región mencionada amplifican también la región ITS. Si se quiere amplificar la región ITS existen los iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G), ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC), ITS3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC), ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (Kurtzman y Robnett 1998; Fell y col., 2000).

De los iniciadores para la subunidad 18S, el NS-7 avance (5'-GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC) pueden servir mejor para basidiomicetos y el NS-7A avance (5'-CTG GGC CGC ACG CGC GCT ACA CTG AC) para ascomicetos, aunque para basidiomicetos también se usan los iniciadores ITS5 y LR6 (Fell y col., 2000).

II.4 PROCESOS BIOQUÍMICOS PARA PRODUCIR ALCOHOL Y SUSTANCIAS QUE DAN SABORES Y AROMAS EN PRODUCTOS FERMENTADOS Y EN FRUTAS

II.4.1 Sabores y aromas presentes en productos fermentados

La elaboración de tepache requiere de una serie de transformaciones de la materia prima utilizada como sustrato, ya sea de frutas o bien de maíz, estos cambios tal vez sean generados por los microorganismos involucrados en la fermentación. Debido a lo anterior, los microorganismos y las enzimas juegan un papel muy importante en la producción de compuestos de sabor, en una amplia variedad de alimentos que el hombre ha utilizado por siglos para incrementar la calidad de éstos (Gatfield, 1986). Mucho antes de que se supiera de la existencia de los microorganismos y de las enzimas el hombre aprendió como usar y explotar su acción fermentativa. Inicialmente el progreso fue hecho con bases empíricas sin el conocimiento biológico de qué sucedía. Hoy en día, con el entendimiento de la actividad microbiana en diferentes alimentos y bebidas, se ha convertido a los microorganismos en un sector importante de la industria de alimentos.

Probablemente la razón más importante para continuar haciendo alimentos fermentados fue el incremento en la vida media del producto después del proceso fermentativo. En el caso de los jugos de fruta fermentada éstos se hacen más estables como resultado de la conversión de azúcar a etanol con las propiedades antimicrobianas de sobra conocidas.

Sin embargo, y a pesar de los cambios que se generan, en la actualidad existen ya otros métodos de conservación más baratos que harían que la fermentación alcohólica no fuera ya importante, pero lo que ha permitido que permanezcan es principalmente los sabores que se producen bajo esos procesos.

Los microorganismos son sistemas vivos y algunos producen metabolitos que son activos en la generación de sabores. Los metabolitos que activan el sabor pueden pertenecer a la mayoría de tipos de compuestos químicos que incluyen ácidos, alcoholes, lactonas, ésteres, aldehídos, cetonas, etc. Si estos materiales se acumulan en el alimento, pueden llegar a influir en el sabor final y además pueden ser manejados como atributos de la calidad de un producto (Gatfield, 1986). Esa gran variedad de compuestos pueden estar presentes en la fermentación de tepache debido a que es una fermentación alcohólica que genera no sólo alcohol sino también otro tipo de sustancias sápidas.

Muchos metabolitos microbianos son compuestos volátiles y en términos de sus propiedades sensoriales pueden ser divididos en dos categorías: productores de olor y de sabor. Dentro del sabor se incluyen salado, ácido, dulce, amargo y umami sabores que pueden ser provocados por aminoácidos, péptidos y azúcares entre otros. Los productores de olor son generalmente volátiles e incluyen compuestos carbonilos ésteres y terpenos por mencionar algunos (Scharpf y col., 1986).

II.4.2 Sabores y aromas asociados a *S. cerevisiae*

Dentro de los compuestos de sabor y aroma que se generan por vía microbiana, las levaduras juegan un papel importante en tres procesos de producción mundial muy alta como son el pan de levadura, la cerveza y el vino. En los tres productos *S. cerevisiae* es el actor principal en la generación de alcohol y de sustancias que dan sabor y aroma. En el caso del pan, el alcohol prácticamente se pierde y son de mayor importancia el CO₂ y los compuestos que dan sabor y aroma. En los dos restantes, el alcohol es el compuesto más importante, sin embargo, muchos de los atributos de calidad de las dos bebidas, están referidos al tipo de sustancias de sabor y aroma que da esta levadura, los que pueden estar complementadas por los compuestos producidos por especies de levaduras silvestres de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Kluyveromyces*

entre otras, y que se encuentran en algunas de estas fermentaciones alcohólicas al inicio de la fermentación o en fase I y también de algunas bacterias que están involucradas en estas biotransformaciones (Mesas y Alegre, 1999).

Estos microorganismos generan etanol y CO₂ a partir de azúcares; algunos estudios han demostrado que los componentes del aroma derivados de la acción de *S. cerevisiae* en una solución de nitrógeno libre de azúcares son muy similares a los que se generan en cerveza, vino, whiskey y cognac, y durante la fermentación de la masa para pan. Muchos de los alcoholes superiores, que son metabolitos secundarios de la fermentación de levaduras, están presentes tanto en pan como en bebidas alcohólicas (Ramey y Ough, 1980).

En el desarrollo del sabor del pan están involucradas *S. cerevisiae* y *Candida utilis*, algunas bacterias también contribuyen al sabor a través de la producción de ácidos orgánicos. Estas bacterias aparecen como contaminantes de las levaduras para panificación y pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. En masas agrias se utiliza *Saccharomyces exiguus*, *S. inusitatus* (= *S. bayanus*) y lactobacilos. Los ácidos que dan sabor a este pan son producidos en el caso de las bacterias a partir de maltosa por la vía de la maltosa fosforilasa. Diferentes ácidos carboxílicos incluyen principalmente láctico y acético, y cantidades traza de los ácidos 2-hidroxipropanóico, 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico y dihidroxibutanedióico. También se han detectado en pan elaborado con masas agrias altos contenidos de 2-propanona, 3-metil-butanal, benzil alcohol y 2-fenil alcohol. Se ha sugerido que la conversión de alcoholes a 2-metil cetonas por el sistema alcohol deshidrogenasa dependiente del NAD es importante en la generación de sabor. Otras sustancias que se producen son alcoholes inferiores, acetaldehído, propanal, pentanal, furfural y etil ésteres como el etil acetato (Berger y col., 1983).

En cerveza aparecen volátiles en bajas proporciones y apenas pueden percibirse, entre ellos están el etanol, 3-metilbutanol, etil acetato, isoanil acetato y etil

hexanoato. Otros compuestos importantes de *S. cerevisiae* son aquellos que contienen sulfuro, y también son importantes para el sabor. Así, el dimetilsulfuro se incrementa durante el curso de la fermentación por medio de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. El metionol es el principal compuesto de sabor y aroma con sulfuro en la cerveza y el vino. Se forma a partir de la descarboxilación de la metionina, por deaminación y descarboxilación hacia aldehído y la reducción a su alcohol correspondiente (Schrier, 1979). Otros compuestos derivados de la levadura que contienen sulfuro son el metionil acetato, etil-3-metiltiopropionato y el 2-metiltetrahidrotifeno-3-ona. También existe la formación de lactona (Schrier, 1979).

El vino, que se describe como una bebida alcohólica ácida contiene un *bouquet* especial de constituyentes volátiles. Los factores que afectan estos constituyentes incluyen a las cepas de levadura usadas, la microbiota del mosto, las condiciones de fermentación, los azúcares residuales y el tipo de materia prima. Sin embargo, algunos de los compuestos del sabor del vino son intrínsecos de la uva, aunque muchos de los sabores del producto final se elevan por la acción bioquímica de las levaduras. También los productos de la autólisis como los aminoácidos pueden jugar un papel importante en el sabor, los subproductos que se generan del autolizado sirven de sustrato para una fermentación secundaria. Los ácidos málico y tartárico también tienen estas funciones. Diversas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* están involucradas en la conversión de ácido málico a láctico y CO₂ que mejoran el sabor y la madurez de los vinos (Mesas y Alegre, 1999).

II.4.3 Sabores y aromas en piña

En relación a diferentes frutos, la piña ocupa un lugar preponderante en la generación de compuestos volátiles que la hacen muy apreciable por esas características. Se sabe actualmente que contiene diversos tipos de compuestos alifáticos, acetaldehído y otros aldehídos, ácido acético y otros ácidos, hidroxí y acetoxi ésteres, tio ésteres, alcoholes, alcanóidos, terpenos, compuestos

fenólicos y α -heterocíclicos. Posee también estructuras sesquiterpenoides. En menor proporción contiene 3,5-undecatrieno y el análogo (Z)-8-tetraeno siendo responsables de la fragancia de la fracción no polar (Berger, 1991).

Parece ser que algunos ésteres como el 2-metilbutanoato y el hexanoato imparten las notas frutales básicas, también contribuyen algunos hidrocarburos insaturados, furanonas sustituidas y alcanóidos. Las altas concentraciones de metil y etil 3-metiltiopropanoato son específicas del sabor a piña, pero estos compuestos provocan confusión o impresión de olores a piña muy madura cuando se agregan a jugo de piña sin procesar.

Todas estas sustancias combinadas en concentraciones muy bajas promueven olores de fruta fresca recién cortada. La desintegración de la pulpa de la fruta sin inactivar la acción enzimática provoca una rápida disminución en las concentraciones de undecaeno (Berger, 1991).

II.5 EVALUACIÓN SENSORIAL

II.5.1 Pruebas con consumidores

Un alto espectro de características sensoriales que incluyen la apariencia, el aroma, el sabor y la textura son usados por los consumidores para adquirir y tomar decisiones sobre lo que consumirá con respecto a un producto determinado (Chambers y Bowers, 1993).

Una prueba con consumidores es una de las más valiosas dentro de la metodología sensorial. A través de ella se pueden responder preguntas importantes acerca del gusto del consumidor como: cuál es el grado de aceptación de un producto, cuál es la preferencia hacia un producto y cuáles son los atributos que percibe basado en sus características sensoriales (Muñoz, 1999).

Cuando se realiza un análisis sensorial con consumidores un producto no tendrá éxito en las ventas solo por que tenga altos promedios hedónicos, las posibilidades para que un producto se poseione del mercado dependen de otros factores como son el precio, la imagen, el envase, el nicho, etc. Sin embargo, un producto que no haya tenido un buen promedio en la prueba de aceptación, muy difícilmente se comercializará a pesar de que haya un gran mercado (Lawless y Heymann, 1998).

Las técnicas sensoriales son ampliamente usadas para observar la reacción del consumidor a una variedad de estímulos. Históricamente las pruebas de aceptación de alimentos con consumidores representan un importante punto de partida para los métodos basados en la opinión de expertos degustadores, o en la asignación de promedios de calidad por un grupo de jueces que buscan defectos en un producto. La información que dé una prueba de aceptación es sumamente útil, y puede ser combinada con otros análisis sensoriales que ayuden a un diseño óptimo de productos alimenticios (Lawless y Heymann, 1998).

II.5.2 Desarrollo de perfil sensorial

Una técnica que a menudo es combinada con el estudio de consumidores es el análisis sensorial descriptivo, que puede considerarse como el paso siguiente en la caracterización sensorial de un alimento, ya que proporciona un lenguaje propio para poder definir y comunicar las sensaciones percibidas. La generación de descriptores es una de las etapas más importantes en cualquier análisis descriptivo (Guerrero y col., 2000).

Los análisis descriptivos multiescalares como los perfiles o el análisis descriptivo cuantitativo son pruebas de gran interés porque permiten analizar y cuantificar los distintos atributos que configuran la calidad sensorial de un alimento. Su uso en el desarrollo de productos o en el análisis de las preferencias del consumidor, hace que su uso sea cada vez más frecuente (Damasio y Costell, 1991).

Los principales objetivos de este análisis es la descripción de la calidad sensorial de un producto en función de los atributos que se perciben del mismo y/o realizar comparaciones entre diversos productos. El análisis descriptivo puede indicar exactamente cual es la dimensión sensorial de las diferencias entre el producto analizado y los de la competencia. Es usado para el desarrollo de productos, con lo que se permite ver que tan cercano está del objetivo la introducción de un producto nuevo o que tanto se asemeja a un prototipo. También puede ser usado en pruebas de vida de anaquel, especialmente si los jueces están bien entrenados y pueden emitir juicios consistentes a lo largo de diferentes evaluaciones del mismo producto, y también puede usarse para control de calidad sobre todo cuando existen quejas por parte de los consumidores (Lawless y Heymann, 1998).

Existen diferentes métodos para generar términos que describen las distintas características de un producto:

Discusión abierta con moderador: los jueces evalúan diversas muestras y comunican los términos que consideran más adecuados para describirlas en discusión abierta, entre el moderador y ellos se eligen los términos que el grupo considera los mejores descriptores.

Discusión entrecruzada: se utilizan consumidores o jueces y consiste en la selección de una triada de muestras que se presentan de dos en dos formando todas las parejas posibles. Para cada pareja, cada persona elabora dos listas una con los descriptores comunes y otra que los diferencian.

Asociación controlada: en donde se solicita al juez que confeccione una lista de palabras que él asocie con los atributos de un producto determinado.

Lista previa: se dispone de una lista previa de descriptores y las muestras, y se pide a los jueces que marquen junto a cada descriptor si los considera críticos o

no. Se establece un criterio para que un término clasificado como crítico con un porcentaje preestablecido de jueces pase a formar parte de la lista definitiva (Damasio y Costell, 1991).

II.5.3 Análisis cuantitativo descriptivo

El análisis cuantitativo descriptivo es una técnica en donde se entrena a individuos que identifican y cuantifican en orden de ocurrencia, las propiedades sensoriales de un producto o de un ingrediente. Estos datos permiten desarrollar modelos multidimensionales apropiados de un producto, en una forma cuantitativa fácilmente entendible tanto en el mercado, como en un medio de investigación y desarrollo. Esta técnica también se ha utilizado con buenos resultados para generar datos acerca de un concepto y de productos ideales antes de que se inicie propiamente su desarrollo (Stone y col., 1974).

El análisis cuantitativo descriptivo fue desarrollado durante los setentas con la intención de incluir estrategias para explicar algunos aspectos de comportamiento de la percepción, siendo muy importante la selección de los jueces y el entrenamiento. También el uso de una escala de intervalo y la evaluación estadística permiten obtener información de efectos de comportamiento que deben ser ajustados a las necesidades del mercado (Piggott y col., 1998).

El análisis cuantitativo descriptivo es capaz de responder a todas las características de un producto como la apariencia, el aroma, el sabor, la sensación, etc. Es un método cuantitativo que permite determinar la confiabilidad individual y de grupo. No requiere un grupo grande de jueces (normalmente entre 6 y 10 jueces) y puede ser usado en cualquier producto. Tiene un procedimiento fácil para el desarrollo del lenguaje y está libre de la influencia del líder de grupo. Tiene un procedimiento para verificar los términos y además es razonablemente rápido (Stone y col., 1980).

Dentro de los análisis descriptivos existen también técnicas alternativas que compiten con el análisis cuantitativo descriptivo o con el desarrollo de perfiles, estas técnicas son el análisis de similitud-disimilitud o el perfil de libre elección. Son técnicas que pueden ayudar de igual manera al desarrollo de productos, vida de anaquel o control de calidad, pero todas tienen ventajas e inconvenientes y por tanto no son capaces de sustituir de forma ventajosa a los análisis descriptivos clásicos como el análisis cuantitativo descriptivo (Damasio y Costell, 1991).

III. JUSTIFICACION

En la actualidad el tepache es una bebida refrescante de consumo popular que se elabora de manera artesanal y que se comercializa principalmente en tepacherías o en taquerías como bebida que calma la sed y ayuda a disminuir los efectos de la pungencia que generan estos alimentos cuando se consumen con salsas picantes. El principal ingrediente que se utiliza para elaborar esta bebida es la cáscara y restos de pulpa de la piña que se eliminan cuando la fruta se consume en fresco; además de esta fruta pueden agregarse otras como naranja, tamarindo, manzana, o arrayán pero siempre predomina como ingrediente principal la piña.

No existen estadísticas exactas que determinen el nivel de producción de esta bebida, el único dato que se tiene es aquel en donde se reporta la producción de pulque y otras bebidas fermentadas incluyendo al tepache, que generaron en promedio en el período de 1989 a 1993 \$ 46.897 millones de pesos observándose una tendencia al incremento, lo que es un indicador del gusto por el consumo de este tipo de bebidas, que se puede seguir explotando e incluso incrementarse (INEGI, 1995).

A la fecha no existe un proceso estandarizado de la producción del tepache, ni se tiene una idea general de las condiciones, microorganismos involucrados o de la combinación de materias primas que se utilizan para elaborar la bebida. Aunado a esto, el producto es de vida corta y constantemente pueden verse afectadas sus características sensoriales debido a que el proceso fermentativo continúa y puede llegar a desestabilizar al producto, convirtiéndolo en una bebida embriagante o bien en vinagre si se deja fermentar demasiado tiempo, en ambos casos no apta para consumirse.

México es un país con una tradición culinaria rica en donde los productos fermentados forman parte de ella. Entre ellos el tepache es una de las pocas bebidas que se consumen a nivel nacional y que han persistido a través del tiempo. Aunque se desconoce cuál es el nivel de aceptación en este momento. Por ello, se pretende conocer las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales que permitan establecer las bases para producir un tepache de forma controlada y tomando ésta como referencia pueda realizarse un escalamiento que de cómo resultado la industrialización de la bebida aprovechando la tendencia actual de regresar al consumo de productos naturales.

Es factible que en el proceso de industrialización del tepache se puedan utilizar los subproductos de la industrialización de la piña. En 2001 la producción fue de 626 mil ton de piña, habiéndose duplicado la producción en 10 años. De éstas, 313 mil fueron procesadas generando un 40% de subproductos (124 mil ton) que en el mejor de los casos se seca, se muele y se utiliza como alimento para ganado, pero que normalmente se descompone y contamina el medio ambiente,. La utilización de estos subproductos en la elaboración del tepache daría un valor agregado a estos residuos y en cierta forma disminuiría el problema de contaminación que genera (COVECA, 2002; de Chávez y col., 1992).

IV. HIPÓTESIS

IV.1 HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

Es factible estandarizar el proceso de elaboración de tepache por medio de la caracterización microbiológica, bioquímica, fisicoquímica y sensorial de muestras comerciales.

IV.2 HIPÓTESIS NULA

No es posible estandarizar el proceso de elaboración de tepache por medio de la caracterización microbiológica, bioquímica, fisicoquímica y sensorial de muestras comerciales

IV.3 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Existen diversos factores que promueven variación en el proceso de elaboración de tepache

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales en muestras comerciales de la Ciudad de México como base para estandarizar un proceso de elaboración de tepache.

V.1.1 Objetivos particulares

Cuantificar, aislar e identificar a la biota de los grupos más importantes presentes en el tepache

Corroborar mediante técnicas moleculares la identidad de las especies de levaduras aisladas de tepache

Determinar diferentes características bioquímicas y fisicoquímicas por métodos instrumentales

Establecer los atributos sensoriales, desarrollar un perfil de sabores y llevar a cabo un análisis cuantitativo descriptivo

Seleccionar las características más relevantes que permitan establecer las bases para un proceso de fermentación controlada de tepache

VI. METODOLOGÍA

VI.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para todo el estudio se utilizaron muestras comerciales de tepache elaboradas en cuatro establecimientos de colonias populares del Norte de la ciudad de México, que tuvieran cuando menos 30 años de existencia y cuyos operarios quisieran proporcionar la mayor información posible sobre el proceso de manufactura. Las muestras de tepache se agruparon de acuerdo con su proceso de elaboración en: A y B preparadas en tres pasos de fermentación, y C y D preparadas en dos pasos (Figura 1).

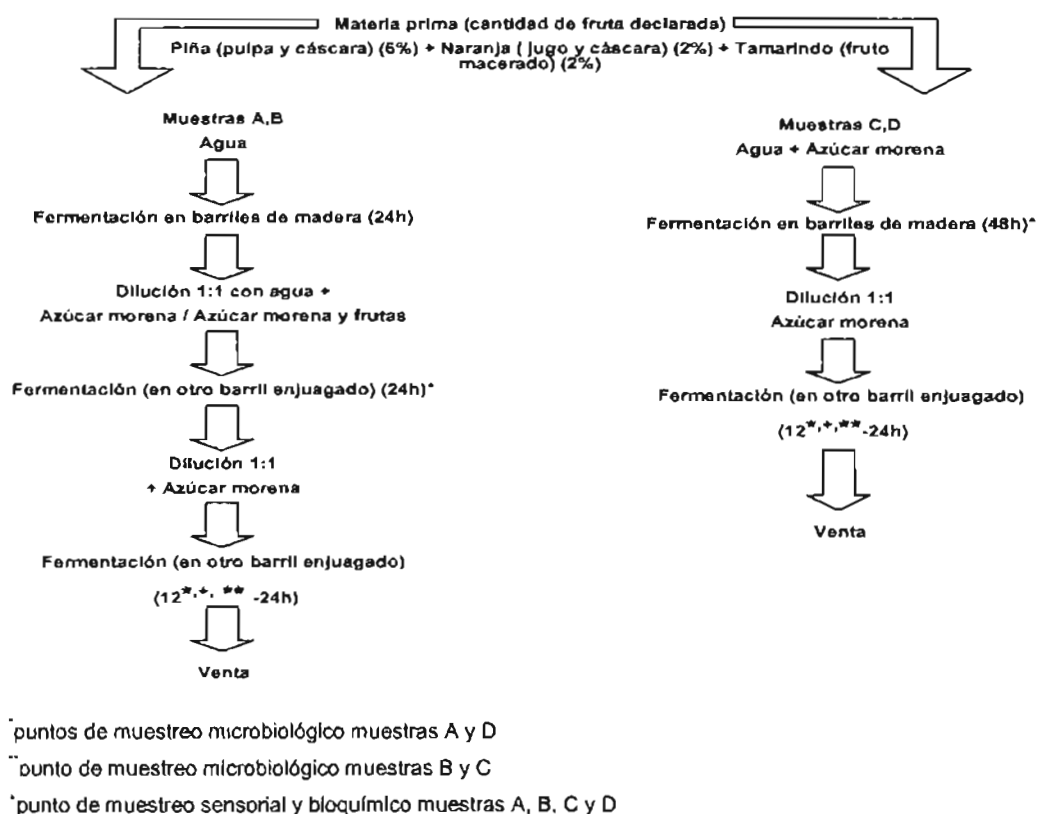


Figura 1. Proceso de elaboración comercial de tepache de las muestras A, B, C y D según productores

La información inicial que se obtuvo y que sirvió como base para la selección de las tepacherías se describe a continuación: este producto se elabora con cáscara de piña, naranja y tamarindo al que se le adiciona agua o agua y azúcar antes de iniciar el proceso en barriles de madera, y se deja fermentar durante 24 ó 48 horas según sea el caso, como se observa en la figura 1. En el proceso con tres pasos de fermentación que se lleva a cabo en dos de las tepacherías (A y B), el líquido se mezcla y posteriormente a las 24 se diluye aproximadamente a la mitad, se le agrega azúcar y algunas veces fruta y se deja fermentar otras 24 h, pasado este tiempo, se vuelve a diluir a la mitad, se le agregar más azúcar, se pasa a otro barril y se deja fermentar cuando menos 12 h más para proceder a su venta. En el proceso con dos pasos de fermentación correspondientes a C y D se deja fermentar 48 h, se diluye a la mitad, se agrega más azúcar y se pasa a otro barril dejando fermentar también cuando menos 12 h antes de iniciar su venta. Cabe aclarar que de las muestras A y D los productores permitieron llevar a cabo el muestreo a las 48 h y 60 h y de las otras dos sólo a las 60 h.

Durante el desarrollo del estudio se estuvo observando en diversas tepacherías, incluyendo las seleccionadas, cómo se elaboraba el tepache. Se hicieron también diversas averiguaciones con los productores. Como resultado de lo anterior y con la caracterización de la bebida se hizo al final un apartado donde se describe la forma de elaboración del tepache, información que complementa la base para la estandarización del proceso de esta bebida.

VI.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

VI.2.1 Cuantificación, aislamiento e identificación tradicional de microorganismos

Para la caracterización de los microorganismos fue necesario realizar la cuantificación de los diversos grupos microbianos, así como el aislamiento, la identificación y la conservación de los microorganismos de esos grupos mediante

técnicas tradicionales, asimismo a todas las cuantificaciones se les realizó un análisis de varianza de dos factores (tiempos de fermentación y lugares de muestreo) para establecer si había diferencias entre las muestras (Hair y col., 1992). Las determinaciones anteriores se basaron en los siguientes pasos:

A partir de las muestras de tepache que se trabajaron por duplicado, se realizaron diluciones decimales en serie de 10^{-1} hasta 10^{-9} en 90 ml de agua peptonada estéril al 0.1%. Se inocularon para la cuantificación de cada grupo microbiano alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10^{-4} a 10^{-9} , excepto para enterobacterias y coliformes fecales y totales que fueron de 10^{-1} a 10^{-3} .

VI.2.1.1 Bacterias lácticas y acéticas

Las bacterias lácticas y acéticas se sembraron en placas de agar nutritivo Wallerstein (aWL) (Difco) adicionado con cicloheximida (0.004 µg/l) que se incubaron en condiciones de anaerobiosis (cámara de anaerobiosis y sistema GASPAC-System BBL No. 270304) y de aerobiosis, ambas a 32°C durante 72 h (Gray, 1951). Se cuantificaron y seleccionaron todos aquellos aislados que produjeran ácido en el medio.

Todas las bacterias que crecieron en anaerobiosis se transfirieron a placas de agar deMan Rogosa y Sharp (aMRS) (Difco) y se desarrollaron nuevamente en condiciones de anaerobiosis. Las bacterias que se desarrollaron en el aWL en condiciones aerobias y produjeron ácido se pasaron por un lado al agar para *Acetobacter* (extracto de levadura 10 g, CaCO_3 10 g, glucosa 3 g, agua destilada 1 l) y se incubaron en condiciones aerobias y por otro se pasaron al agar MRS y se desarrollaron en condiciones anaerobias. Todas se incubaron a 32°C durante 72 h para determinar en forma presuntiva si eran bacterias lácticas o acéticas. Aquellas que se desarrollaron en el medio MRS bajo anaerobiosis se tomaron presuntivamente como bacterias lácticas, las que se desarrollaron en el agar para

Acetobacter en condiciones aerobias se consideraron como bacterias acéticas (deMann y col. 1960; Stiles y Hopzapfel, 1997).

A cada aislado de bacterias lácticas seleccionado se le realizó la tinción de Gram, las pruebas de catalasa y oxidasa, morfología celular y las siguientes pruebas:

Producción de gas (CO₂): Se determinó la producción de gas en tubo por el método de Gibson y Abd-el-Malek (1945) en caldo MRS con campana de Durham y en aMRS semisólido modificado, sustituyendo el citrato de triamonio por sulfato de amonio, los tubos fueron incubados 10 días a 25°C y observados diariamente.

Desarrollo a pH 4.5, 4.8, 7 y 9.6 en aMRS en anaerobiosis ajustando el pH con HCl y NaOH respectivamente. (pH 4.2, 7.5 y 8.5 para *Pediococcus* y pH 4.8 y 6.5 para *Leuconostoc*).

Tolerancia a la sal fue observada en aMRS adicionado con 3, 4, 6.5 y 18% de NaCl.

Hidrólisis de arginina fue probada en caldo MRS sin glucosa y extracto de carne pero con 0.3% de arginina y 0.2% de citrato de sodio en lugar de citrato de triamonio. El amonio fue detectado usando el reactivo de Nessler (MacFaddin, 2003).

Evaluación de la producción de D(-) y L(-) lactato a partir de glucosa usando D(-) y L(-) lactato deshidrogenasa (Boheringer Mannheim).

La identificación se realizó con el sistema API 50 CH utilizando el medio 50 CHL (bioMeriux), para aquellas bacterias lácticas que no pudieron identificarse con este sistema, aparte de las pruebas ya mencionadas, se realizó la fermentación de diversos carbohidratos según el esquema de Sharpe (1979), los carbohidratos fueron agregados al medio basal (MRS sin glucosa ni extracto de carne, pero con

0.004% de rojo de clorofenol) utilizando soluciones esterilizadas por filtración de los siguientes carbohidratos (0.5% p/v): D-arabinosa, L-arabinosa, celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-lactosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, L-ramnosa, D-ribosa, salicina, D-sorbitol, sacarosa, trehalosa, D-xilosa, esculina y arbutina incubados a 25°C en anaerobiosis con sistema GasPak y analizados después de 2 y 5 días.

En los aislados seleccionados como bacterias acéticas se observó su morfología celular y se les realizaron tinción de Gram y prueba de catalasa. Se seleccionaron los bacilos Gram negativos, catalasa positivos.

A cada aislado se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas y fisiológicas: la habilidad para desarrollarse a pH 4.5, sobreoxidar etanol y lactato, desarrollo en acetato de sodio, cetogénesis de glicerol, desarrollo en dulcitol y producción de pigmento café en el medio glucosa extracto de levadura carbonato de calcio (GYC) (extracto de levadura 10 g, CaCO₃ 30 g, glucosa 50 g, agua destilada 1 l, agar bacteriológico 20 g) (Drysdale y Fleet, 1988).

VI.2.1.2 Bacterias mesófilas aerobias

Las bacterias mesófilas aerobias se sembraron en placas agar cuenta estándar (aCE) y se incubaron a 37°C durante 48 h (Swanson y col., 1992; Maturin y Peeler, 2001). De éstas se seleccionaron colonias de las diluciones más altas. Se observó su morfología, y se les realizó tinción de Gram, producción de esporas y pruebas de catalasa y oxidasa. Aquellas bacilos aerobios gram positivos, que presentaron esporas fueron purificados y se resembraron en agar manitol yema de huevo polimixina y posteriormente se identificaron con el sistema API 50CH y el medio 50 CHB (bioMeriux) para *Bacillus*.

Aquella bacterias con forma cocoide gram positivos, catalasa positivos se desarrollaron en agar manitol sal y en agar Baird Parker, seleccionando las

colonias características de *Micrococcus*; en ellas se observó la hidrólisis de arginina y esculina; la producción de ácido a partir de glucosa, glicerol y manosa; el desarrollo en 40% de bilis; la resistencia a la sal en agar nutritivo con 15% de NaCl; prueba de oxidación/fermentación en el medio OF de Hugh y Leifson con glucosa y con manitol; pigmentación en agar nutritivo; producción de ácido a partir de glucosa, manosa y glicerol; desarrollo a 37°C y desarrollo en agar citrato de Simmons (MacFaddin, 2003).

VI.2.1.3 Bacterias coliformes y *Enterobacteriaceae*

Las bacterias coliformes totales y fecales se determinaron por la técnica de NMP a 37°C por 48 h (Feng y col., 2001; Hitchins y col., 1992).

Finalmente se cuantificaron las *Enterobacteriaceae* en agar bilis rojo violeta con glucosa y en agar MacConkey, incubando a 32°C durante 48 h (Hitchins y col., 1992).

Las colonias de coliformes de los tubos positivos se sembraron en agar eosina azul de metileno (aEMB). Las enterobacterias aisladas de las diluciones más altas fueron aisladas y purificadas. Se observó en ambas la morfología celular, se les realizaron la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa y fueron identificadas con el sistema API 20E (bioMeriux).

La caracterización e identificación de las bacterias que no se lograron identificar con los sistemas API se realizó conforme a las metodologías y claves compiladas en el manual de Bacteriología sistemática de Bergey (1986).

VI.2.1.4 Levaduras y hongos

La cuantificación de las levaduras se hizo utilizando las mismas diluciones y la técnica que para las bacterias: poniendo las diluciones en placas de agar rosa de

Bengala-dicloran-cloranfenicol (aRBDC) (Difco) (Mislevic y col., 1992), de extracto de malta-extracto de levadura (aEMEL) (Difco) y de agar extracto de malta (aEM) (Difco). Las placas se incubaron a 27°C durante diez días y se cuantificaron las ufc/ml de tepache (Mislevic y col., 1992), las colonias con morfología colonial diferente se aislaron y resembraron primeramente en aRBDC y de allí se resembraron en agar glucosa-extracto levadura peptona (GELPA) y en agar extracto de malta (aEM) hasta la obtención de cultivos axénicos, las que se mantuvieron en tubos con medio GELPA a 4°C (van der Walt y Yarrow, 1984; Yarrow, 1998).

La identificación de las levaduras se hizo de acuerdo al esquema de Yarrow (1998) donde se observaron las características de: reproducción asexual y sexual, morfología celular y colonial, tendencia hacerse filamentosas; pruebas fisiológicas y bioquímicas de fermentación de carbohidratos, asimilación de compuestos de carbono y de nitrógeno; producción de ácido a partir de glucosa, formación de almidón, hidrólisis de urea, resistencia a la cicloheximida, licuefacción de la gelatina y reacción colorida al azul de diazonio B; desarrollo a altas presiones osmóticas y a diferentes temperaturas. Con estos resultados se siguieron las claves de los tratados de Barnett y col, (1990, 2000), Kurtzman y Fell (1998) y/o la base de datos de la colección CBS (Centraalbureau voor Schimmelculture, 2004).

VI.2.2 Secuenciación del dominio D1/D2 del gene 26S del ADNr de levaduras seleccionadas

Aquellas levaduras que no se lograron identificar o que algunas de sus características morfo-fisiológicas fueron diferentes a las descritas en las diagnósis de las especies de las monografías de Barnett y col, (1990, 2000), Kurtzman y Fell (1998) o de la base de datos del CBS (2004), se agruparon en biotipos, tomando como base aquellas que compartieran las mismas diferencias. De estos biotipos se seleccionaron algunos aislados con el objeto de corroborar su identidad por

taxonomía molecular mediante la secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S del ADNr.

Para obtener el ADN de las levaduras seleccionadas, éstas se inocularon en tubos con GELPA inclinado los que se incubaron a 30°C durante 24 h. Posteriormente se adicionaron 2 ml de agua destilada estéril a cada uno de los tubos para obtener una suspensión de células. La suspensión de células se transfirió a tubos Falcon con 30 ml de caldo ELEM y se incubaron en agitación a 25°C durante 24 h.

Los tubos Falcon se centrifugaron a 3 000 rpm/2 h, se eliminó el caldo YM, se agregaron 30 ml de agua destilada para lavar las células, se resuspendieron nuevamente en agua con una pipeta y se centrifugaron otra vez bajo las mismas condiciones.

Se agregaron 2 ml de agua destilada y se resuspendieron las células con la punta de una pipeta, se repartieron los 2 ml de la suspensión en dos tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 min. Se removi6 el sobrenadante.

El rompimiento de la pared celular se hizo con el método mecánico, adicionando a cada tubo Eppendorf con la suspensión de células, una columna de 0.5 mm de perlas de cristal de 425 a 600 micrones, lavadas en ácido (Sigma, G8772). La pared de las células se rompió con la punta de una pipeta, procurando formar una emulsión para asegurar un rompimiento adecuado. Los tubos se agitaron en un agitador rotatorio a máxima velocidad durante 20 min.

La extracción de ADN se realizó con el método del fenol-cloroformo. Se adicionaron 100 µl de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA (di sodio) pH 8 25 mM, SDS 0.5%, ddH₂O) a cada tubo Eppendorf y se mezclaron las células ya rotas con la punta de una pipeta conforme se agregaba el amortiguador. Los tubos se agitaron en el vórtex hasta

obtener una mezcla homogénea. Se repitió esta operación 6 veces alternando 30 seg en el vórtex y 30 seg en hielo. A continuación los tubos Eppendorf se centrifugaron a máxima velocidad (15 mil rpm) por 10 min.

Se removió el sobrenadante, procurando no tocar las perlas de cristal, se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregó 490 µl de la solución de fenol y se agitó en el vórtex brevemente. Se agregó 210 µl de cloroformo y se volvió a mezclar en el vórtex. Se centrifugó a máxima velocidad por 10 min, repitiendo el paso anterior 3 veces.

A continuación se removió la fase acuosa superior a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregó 500 µl de cloroformo y se agitó en el vórtex hasta que la mezcla se enturbio. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. Se removió nuevamente la fase acuosa superior y se pasó a un nuevo tubo Eppendorf.

Se adicionó 324 µl de isopropanol y se mezcló brevemente en el vórtex observando la formación de un precipitado del ADN. Nuevamente se centrifugó a máxima velocidad por 3 min y se decantó suavemente el sobrenadante. Si no se observaba la formación de un precipitado se congeló por 20 min y se agregó 4 µl de acetato de sodio o de amonio 3 M, centrifugando por 3 min a máxima velocidad y decantando el sobrenadante. Inmediatamente se lavó cuidadosamente el ADN con 1000 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a máxima velocidad por 3 min y se decantó cuidadosamente el sobrenadante de etanol.

Mientras el ADN estaba húmedo, se agregaron 100 µl de agua bidestilada estéril, despegando el ADN del fondo del tubo y se calentó el tubo Eppendorf en baño de agua a 55°C durante 15 min o hasta que el ADN se disolviera por completo. De esta preparación se obtuvo el stock genómico de ADN. Se almacenaron las muestras a -20°C hasta que se hizo la secuenciación.

Para realizar la reacción de amplificación se diluyó el ADN adicionando a 996 μl de agua bidestilada estéril 4 μl del “stock”. La dilución del ADN (templado) fue utilizada para la amplificación simétrica. En la Tabla 1 se muestra la cantidad de reactivos de la mezcla maestra necesaria para una reacción de PCR

Tabla 1. Cantidad de reactivos necesarios en la mezcla maestra

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (μl)
H ₂ O estéril (QSP)			34.5
Amortiguador PCR (KCl 1 M 12.5 ml, Tris-HCl 1 M pH 8.4 2.5 ml, MgCl ₂ 1 M, 625 μl gelatin 2.5 mg, ddH ₂ O 9.37 ml)	10 X	1 X	5.0
Mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs)	10 mM/ μl	0.2mM/ μl	4.0
Iniciador externo 5' final	10 pmol/ μl		2.5
Iniciador externo 3' final	10 pmol/ μl		2.5
Taq polimerasa			0.5
Volumen final			49.0

(Morales C., comunicación personal)

En un tubo del termociclador de 500 μl se transfirieron 49 μl de la solución de mezcla maestra y 1 μl del templado obteniéndose un volumen final de 50 μl , se agitó y centrifugó por algunos segundos (10 seg) a una velocidad de 3 000 rpm.

Los iniciadores universales utilizados fueron el NL-1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG) y el NL-4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G) y la polimerasa fue Gold Taq-polimerasa (Boheringer y QIA DNA minikit QIAGEN).

Los tubos con las muestras se colocaron en el equipo termociclador (GENEAMP PCR System 9700 Perkin Elmer) y se amplificaron conforme el siguiente programa

Precalentamiento: 95°C 12 min

Desnaturalización: 94°C por 1 min

Alineamiento: 52°C por 55 seg

40 ciclos Extensión: 72°C por 2 min

Extensión final: 72°C 8 min

Programando el termociclador para que se mantuviera a 4°C, una vez que hubieran terminado todos los ciclos. Por electroforesis en un gel de agarosa (1%) con una solución amortiguador TAE 1X se verificó la calidad del producto de PCR. Los pozos del gel se cargaron con una mezcla con 3 µl del producto de PCR y 8 µl de la mezcla de tinción. La electroforesis se corrió durante 15-20 min a 85-100 volts. El gel se reveló durante 10 min en una solución de 50 ml de agua bidestilada y 20 µl de solución de bromuro de etidio. El gel se observó y fotografió en un transiluminador UV.

El amplicón se limpió transfiriendo 45 µl del ADN a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 240 µl de una solución de NaCl y se mezcló en el vórtex. Se agregó 10 µl de "glass milk" a cada tubo, se mezcló nuevamente en el vórtex, y se colocaron los tubos en el agitador rotatorio por 20 min. Se centrifugaron a máxima velocidad por 1 min y se eliminó el sobrenadante.

A continuación se adicionaron 500 µl de "New Wash", a -20°C, se agitó el tubo en el vórtex y se centrifugó a máxima velocidad 1 min, se eliminó el sobrenadante. Y se repitió este paso 4 veces.

Se diluyó el ADN del "glass milk" y el producto de PCR se purificó con el kit Geneclean 101 (La Joya, Cal.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregó 35 µl de agua bidestilada e incubó a 55°C por 30 min, se centrifugó a máxima velocidad 1 min y se transfirió el sobrenadante de ADN a un nuevo tubo de 500 µl.

Para realizar el marcaje se ajustó:

La concentración de ADN se determinó con 5 µl ADN y 195 µl ddH₂O midiendo la absorbancia a 260 nm, 280 nm y 320 nm.

Se secó el amplicón a temperatura ambiente en una microcentrífuga de vacío. El ADN seco se resuspendió en el vórtex con agua bidestilada utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l ddH}_2\text{O} = A_{260} \text{ de la muestra} / 0.057 \times 70$$

La mezcla (Tabla 2) para la reacción de marcaje se preparó a un volumen final de 20 µl para cada reacción y se colocó en el termociclador.

Tabla 2. Mezcla utilizada para la reacción de marcaje

Reactivos	Cantidad
"Big Dye" con Amply Taq FS	8.0 µl
Iniciador (0.8 pmol/µl)	3.2 µl
Amplicón ADN limpio (100 ng/µl)	Según concentración ADN
H ₂ O bidestilada	Ajustar a 20 µl

Además para la reacción se puso un control sin ADN y los mismos reactivos que se muestran en la Tabla 2.

Para cada muestra de ADN se hizo una reacción con el iniciador de avance NL1 5' final y una reacción con el de reversa NL4 3' final.

El ADN marcado se agitó en el vórtex y se centrifugó durante 10 seg a 3 000 rpm (Sanger y col., 1977). A continuación se amplificó en el termociclador, usando el siguiente programa:

	Desnaturalización:	96°C por 10 seg
25 ciclos	Alineamiento:	50°C por 5 seg
	Extensión:	60°C por 4 min
	Extensión final:	60°C por 4 min

El amplicón marcado se purificó en columnas de Sephadex superfine (Pharmacia-Biotech G50). Se agregó 800 µl de agua bidestilada a las columnas, hidratándolas previamente por un mínimo de 3 horas y una vez hidratadas se eliminaron las burbujas. La columna se pasó a un tubo de lavado especial y se precentrifugaron a 3 000 rpm por 2 min (Sanger y col., 1977).

20 µl de la muestra de reacción marcada se pusieron 1 en la columna de purificación y se centrifugó a 3 000 rpm durante 3 min. Se secó en la microcentrifuga de vacío durante 25 min o hasta obtener un volumen aproximado de 5 µl en el tubo. Se agregó 20 µl de amortiguador TCR. El tubo se colocó en baño maría a 96 C durante 3 min e inmediatamente se pasó a baño de hielo.

Se colocaron las muestras marcadas y purificadas en los tubos del secuenciador y se taparon con los septos, manteniéndolas en el baño de hielo hasta que entraron en el secuenciador. La secuencia se realizó en el secuenciador ABI-PRISM 310 Applied-Biosystem. El análisis y edición de las secuencias obtenidas se hizo con el programa bioedit 5. Finalmente se compararon las secuencias obtenidas con las

existentes en el GenBank usando el Blast-Program y algunas se registraron en esa base de datos y se reportan los números de acceso (Altschul y col., 1997).

VI. 3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FÍSICOQUÍMICA

VI.3.1 Determinaciones de ácidos láctico y acético, etanol, proteína cruda, pH, acidez titulable y °Brix

Todas las determinaciones se repitieron 6 veces en muestras de tepache de 60 h de fermentación de los 4 lugares de muestreo.

Los ácidos láctico y acético, y el etanol se determinaron por HPLC Perkin-Elmer Sigma con columna de vidrio poropack Q de 5"/1.8" a una temperatura de la columna de 50°C con detector de índice de refracción LC-30, volumen de inyección 100 µl y flujo de 0.6 ml/min de fase móvil de H₂SO₄ 30 mM bajo la técnica de ácidos grasos volátiles y alcoholes (Armijo y col., 1991). Previamente las muestras se filtraron y el gas se eliminó mediante sonicación.

La proteína cruda se determinó por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1999). La medición de pH se hizo directamente en la muestra con un potenciómetro calibrado a dos puntos, pH 4 y 7 a temperatura ambiente (Conductronic pH 20). La acidez titulable se realizó en alícuotas de 50 ml de muestra y 50 ml de agua titulándose con hidróxido de sodio 0.1 N, y expresándose como % de ácido láctico. Los grados Brix se midieron con un refractómetro Westover Mod. RHB-32ATC de 0-32 °Brix (A.O.A.C., 1999).

A todas las determinaciones se les aplicó un análisis de varianza de una vía para establecer si había diferencias entre bebidas (Hair y col., 1992).

VI.3.2 Extracción de compuestos volátiles

En esta fase la determinación de compuestos volátiles se realizó por triplicado en las muestras de 60 h de fermentación de los 4 lugares de muestreo.

Para obtener los compuestos volátiles del tepache, inicialmente se probaron diferentes técnicas como la de espacio de cabeza dinámica y estática a temperatura ambiente pero no se obtuvieron extracciones significativas por ello se decidió utilizar la técnica de extracción líquido-líquido la cual se llevó a cabo usando un litro de muestra de tepache adicionado con 180 ml de CH_2Cl_2 con 10 min de agitación manual en un embudo de separación de 1 litro dividido en tres porciones (333.3 ml de muestra de tepache x 60 ml de CH_2Cl_2). La mezcla se centrifugó a 5 000 rpm en una centrífuga SORVAL refrigerada a una temperatura de 4°C durante 20 min recuperando el CH_2Cl_2 con los volátiles extraídos en un embudo de separación; la fase intermedia que no se separaba se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones.

El CH_2Cl_2 se evaporó con el objeto de concentrar los volátiles extraídos a una temperatura de 39°C en un sistema de destilación sellada con reflujo hasta tener un volumen aproximado de 3 ml. Inmediatamente se pasó a un “quickfit” sellado y se evaporó hasta que quedaran aproximadamente 50 μl , se selló y se conservó a -20°C hasta realizar el análisis de cromatografía.

Durante el tratamiento de extracción se adicionó a cada muestra 3 microlitros de 3-octanol para utilizarlo como estándar interno y poder determinar la concentración de los volátiles obtenidos de las diferentes muestras analizadas.

Antes de someter las muestras de los volátiles extraídos a la cromatografía de gases se agregaron 100 μl de CH_2Cl_2 y la muestra se hizo pasar a través de una columna de Na_2SO_4 anhidro con el objeto de remover cualquier cantidad de agua que hubiera en las muestras.

VI.3.3 Determinación de compuestos volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La separación de los compuestos volátiles se realizó por cromatografía de gases espectrometría de masas (GC-MS) en un cromatógrafo Hewlett Packard serie II modelo 5890 (Palo Alto Cal.) acoplado a un espectrómetro de masas de flujo de electrones Hewlett Packard modelo 5972. Se utilizaron 2 µl de muestra, los compuestos volátiles fueron separados en una columna capilar SUPELCOWAX 10 de 25 m de longitud, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura del inyector de 200°C, temperatura del detector de 250°C y 70 eV de potencial eléctrico una presión en el inyector de 5 psi, la rampa de temperatura del horno de 44°C por 2 min ascendiendo 15°C cada minuto hasta 80°C por 1 min, posteriormente se modificó ascendiendo 3°C cada minuto hasta llegar a 200°C manteniéndose durante 20 min, la división de flujo fue 2ml/min, el gas acarreador fue helio de ultra alta pureza.

Los compuestos volátiles fueron identificados por medio del tiempo de retención y el índice de retención de Kovats. Los índices de Kovats fueron calculados usando una serie de hidrocarburos (C₈-C₂₆) marca Aldrich.

VI.4 CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL TEPACHE

VI.4.1 Principales atributos sensoriales del tepache percibidos por consumidores

VI.4.1.1 Selección de consumidores

Se realizó una entrevista personal a consumidores interceptados cerca de establecimientos donde se vendía tepache, en el norte de la ciudad de México, a través de un método no-probabilístico por cuota con personal entrenado en la aplicación de encuestas (ASTM, 1979). A los entrevistados se les aplicó un

cuestionario filtro preguntándoles, su ingreso anual, si les gustaba el tepache y la frecuencia de consumo de la bebida. La pre-selección fue hecha con aquellas personas que pertenecían al nivel socioeconómico D (ingreso anual menor a \$47,500.- pesos) (INEGI, 1997; INEGI, 2000), que les gustara el tepache y que lo consumieran cuando menos una vez al mes. Si cumplían con estos requisitos, se les invitaba a participar en la evaluación del tepache. Los consumidores seleccionados fueron 420 de los cuales el 70% fueron hombres y el 30% mujeres.

VI. 4.1.2 Evaluaciones

A los consumidores se les dieron muestras frescas que fueron guardadas a una temperatura entre 5 y 10°C hasta que realizaban la evaluación. Cada muestra fue presentada en vasos de plástico transparente sin olores o sabores extraños, y fueron identificadas con tres números al azar. El volumen de la muestra fue de 70 ml con la posibilidad de probar más si el consumidor lo pedía.

El estudio se realizó en seis sesiones con 70 consumidores cada una. En cada sesión se realizó una comparación pareada entre dos muestras ofrecidas (AB, AC, AD, BC, BD, CD). La evaluación de las muestras fue realizada en forma monádica, en la cual se le ofreció a cada consumidor la primer muestra y se le preguntó que diera el nivel de aceptación de primera impresión, usando una escala hedónica estructurada de 9 puntos, donde 9 indicaba “me gusta en extremo” y 1 “me disgusta en extremo”. A continuación se le pidió que evaluara los atributos sensoriales de apariencia, consistencia, olor, sabor, relación dulzor/acidez y la intensidad de sabor en una escala hedónica estructurada de 5 puntos donde 5 indicaba “me gusta mucho” y 1 “me disgusta mucho”. Finalmente se le pedía que opinara sobre el gusto global de la bebida en una escala hedónica de 11 puntos, donde 10 significaba “excelente” y 0 “totalmente inaceptable”. Este procedimiento se repitió con una segunda muestra (prueba secuencial balanceada). Una vez que terminaba de evaluar la segunda muestra, se le presentaban ambas y se le pedía que las comparara para establecer la preferencia entre las dos, incluyendo

comentarios acerca de porqué le había gustado o disgustado (Meiselman, 1994; Shutz, 1994).

Se utilizaron escalas con diferentes puntos con el objeto de minimizar el error de habituación causado por emplear la misma escala, lo que induce a dar la misma respuesta a un estímulo (Pedrero y Pangborn, 1989; Moskowitz, 1994, 1995).

VI.4.1.3 Tratamiento estadístico de pruebas con consumidores

Se utilizó un diseño factorial de 70 consumidores por muestra. Se hicieron tres repeticiones de cada bebida para cada combinación factorial. Se hizo un ANDEVA de tipo III, donde las interacciones fueron incluidas en la estimación del error. En la prueba de F se aplicó la diferencia mínima significativa (DMS) en aquellos datos donde se presentaron diferencias significativas. Después se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en una matriz de covarianza con rotación varimax en los dos primeros componentes (Pastor y col., 1996; Lawless y Heymann, 1998; Siret e Issanchou, 2000).

Se establecieron las diferencias entre muestras pareadas en la prueba secuencial y las diferencias entre mujeres y hombres por medio de ANDEVA de una vía. La influencia en la frecuencia de consumo sobre la aceptación global fue establecida por medio de regresión cuadrática (Shutz, 1994). Se usó el programa Statgraphics 7 para analizar los datos.

VI.4.2 Desarrollo de descriptores con jueces entrenados

VI.4.2.1 Adiestramiento específico de jueces entrenados

Para el adiestramiento, se utilizó un grupo de 8 jueces previamente seleccionados y entrenados que forman parte del personal de la Universidad Iberoamericana; que tuvieran interés en participar en las pruebas, con un umbral

de percepción normal para los 4 gustos básicos, capacidad discriminativa de aromas comunes e identificación de sabores y aromas en pruebas ciegas. Para medir su capacidad discriminativa se realizó un análisis secuencial para cada juez, tomando en cuenta los valores que marca la norma, los cuales son: $P_0=0.4$ que es el límite de rechazo y un $P_1=0.75$ que es el límite de aceptación, se trabajó con un $\alpha=0.5$ y $\alpha=0.05$. Se les aplicaron en total 20 pruebas triangulares con sus respectivas repeticiones (3) lo que dio un total de 60 evaluaciones. En cada sesión se fue aumentando la dificultad de las pruebas discriminativas. Todos los jueces tuvieron capacidad discriminativa, por lo que se continuó hacia el manejo de escalas, en donde tuvieron capacidad de reproducibilidad y manejo de escalas, sin diferencias estadísticas en sus juicios para cada juez, los jueces fueron entrenados durante dos años en la evaluación sensorial del tepache, teniendo una preparación de 120 horas para el análisis cuantitativo descriptivo (Shutz, 1994; Meiselman, 1994).

VI.4.2.2 Generación de descriptores

Para la preparación de los jueces hacia la evaluación del tepache, se llevaron a cabo 2 sesiones semanales de dos horas cada una con el objeto de familiarizar a los jueces con el producto, tomando en cuenta los atributos inherentes de la bebida y los resultados del estudio previo con consumidores (Moreno-Terrazas y col., 2001). Estas sesiones se manejaron en forma grupal con la técnica de lluvia de ideas que permitió generar descriptores luego de llegar a un consenso en la definición de cada descriptor. La generación de descriptores se trabajó con la técnica de descripción entrecruzada con 4 muestras comerciales que se les presentaron a los jueces, formando todas las parejas posibles, cada una con una repetición, dando esto 6 combinaciones con una repetición, por lo que cada muestra se usó 6 veces en la dinámica. En las evaluaciones cada juez elaboró primero una lista las características comunes de cada par ofrecido y en otras las que las diferenciaban (Damasio y Costell, 1991).

Posteriormente por consenso grupal y dirigidos por un líder del panel se realizó una depuración, homogeneización, agrupación y descripción final de los conceptos; por lo que en la siguiente sesión se iniciaba con la lista generada previamente por ellos, y se iban anexando en la siguiente sesión aquellos que a juicio del grupo fueran nuevos, esta secuencia de entrenamiento se siguió hasta el final de la evaluación de las muestras de acuerdo al diseño (Damasio y Costell, 1991).

Los descriptores fueron evaluados individualmente en una escala no estructurada de 150 mm marcada en los extremos de menos a más excepto para color, que iba de cobre claro a cobre oscuro. Los resultados de la evaluación fueron convertidos a números midiendo la distancia en mm del lado izquierdo de la escala a la marca de intensidad de cada descriptor.

Se establecieron algunas referencias y se tomaron de la literatura otras en forma individual o combinada para utilizarlas como estándares de referencias físicas. Se probaron con el panel hasta establecer por consenso, un lenguaje apropiado y además permitir la calibración de los jueces en el uso de la escala de intensidad. Las referencias fueron presentadas junto con las muestras de tepache, así como una carta donde se describía el significado de cada descriptor (Stampanoni, 1997).

Los descriptores generados para cada uno de los atributos de apariencia, olor, gusto, sabor-aroma y sabor residual, se analizaron por medio de un análisis de componentes principales considerando los tres primeros componentes para establecer cuáles eran los más importantes como descriptores de la bebida también por medio del programa Statgraphics plus versión 7.0.

Después del análisis y con el objeto de reducir lo más posible la lista de descriptores se trató de eliminar a aquellos que pudieran tener un significado semejante o bien de agrupar varios descriptores en uno solo después de discutir el líder del grupo con los jueces. De esta forma se logró eliminar algunos términos

redundantes a través de localizar las similitudes entre ellos. También en la reducción de términos se utilizó un análisis de frecuencia y se eliminaron aquellos cuya frecuencia era menor a 20% (Damasio y Costell, 1991).

VI.4.2.3 Validación de descriptores

Para la evaluación de los descriptores se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de tres factores (jueces-descriptores-niveles) en un diseño de bloques al azar, para cada descriptor, en aquellos donde se detectaron diferencias significativas se utilizó una prueba de rangos de diferencia mínima significativa (DMS) a un 95% de confianza con el fin de establecer el desempeño de los jueces y las diferencias entre productos. En aquellos descriptores en donde los jueces no tuvieron capacidad discriminativa se realizó un análisis generalizado de Procrustes que permite homogeneizar la variabilidad entre jueces, aunado a esto, con aquellos descriptores que se dificultaba la evaluación se dieron en cada evaluación, referencias y el significado de cada descriptor para que los jueces llegaran a desarrollar mejor la capacidad discriminativa para esos descriptores (Damasio y Costell, 1991; Pastor y col., 1996).

VI.4.3 Análisis cuantitativo descriptivo (ACD)

Se evaluaron las muestras de los mismos 4 lugares usados para el estudio con consumidores (Figura 1), se realizaron 6 réplicas evaluando dos muestras en cada sesión. Los tepaches fueron servidos en vasos de plástico transparente brillante marcados con tres números elegidos al azar y cubiertos con tapa y se sirvieron en orden balanceado para las diferentes repeticiones. Se utilizaron galletas de soda entre las muestras. Los descriptores fueron evaluados individualmente de la misma forma que cuando se desarrollaron los descriptores, utilizando una escala no estructurada de 150 mm marcada en los extremos de menos a más excepto para color que iba de color cobre claro a cobre oscuro. Los resultados de la

evaluación fueron convertidos a números midiendo la distancia en mm del lado izquierdo de la escala a la marca de intensidad de cada descriptor.

VI. 4.3.1 Análisis estadístico ACD

La confiabilidad de las mediciones del grupo de jueces fue evaluado mediante un análisis de varianza de tres vías (juez-muestra-réplica) sin efecto por interacciones. Para cada muestra el análisis cuantitativo descriptivo consistió en 32 parámetros x 7 jueces x 6 réplicas. En aquellos descriptores donde se detectaron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se realizaron pruebas de comparaciones pareadas de DMS para establecer las diferencias entre medias (Pastor y col., 1996; Lawless y Heymann, 1998; Siret e Issanchou, 2000).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. 1 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

VII.1.1 Cuantificación de microorganismos

Los resultados de la microbiota (Tabla 3) indican que los promedios de las cuentas de, bacterias lácticas, bacterias acéticas, mesófilos aerobios y levaduras estuvieron entre 10^7 - 10^8 ufc/ml (5.83-8.56 log ufc/ml) para las muestras de fermentaciones intermedias (48 h), y entre 10^6 - 10^7 ufc/ml (5.27-7.37 log ufc/ml) en productos finales (60 h), observándose diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los productos intermedios y los finales. Es importante resaltar que por la información obtenida con los proveedores generalmente al preparar el producto final, que es el que sale a la venta, se diluye con agua y se le adiciona azúcar hasta ajustar normalmente a 11 o 12 °Bx, esa dilución es tal vez lo que hace que baje la cuenta total de microorganismos de los grupos mencionados.

Es importante tomar en cuenta que por ser una fermentación mixta láctica-alcohólica y tal vez acética, y por ser una bebida refrescante (debido a su contenido de ácido láctico y de CO_2) con bajo contenido de alcohol, se esperaría que predominasen las bacterias lácticas y las levaduras, y que la cuenta de bacterias acéticas fuese menor, como se ha observado en productos donde se ha establecido claramente la sucesión de microorganismos, como en el caso del tepache elaborado con tibicos en una fermentación controlada, sin embargo, para este estudio esto no pudo observarse (Rubio y col., 1993).

Lo anterior puede deberse a que los productores acostumbran mezclar tepaches con diferentes grados de fermentación, con el objeto de tener siempre un producto con características similares; así, si el producto no se desplaza con la rapidez que ellos desean, adicionan un tepache “tierno” para que el sabor no sea tan fermentado, si por el contrario las ventas son muy altas, tienen un barril con

tepache más fermentado y adicionan agua o también tepache “tierno” para balancear el producto de venta.

Tabla 3. Cuenta total de microorganismos aislados de muestras de tepache con dos y tres pasos de fermentación (log ufc/ml)

Muestra	levaduras	bact. lácticas	bact. acéticas	c. t. mesofílicos	<i>Enterobacteriaceae</i>	coliformes totales nmp/ml	coliformes fecales nmp/ml	mohos
48 h fermentación muestra A	5.83	8.56	6.66	5.86	4.23	<3	<3	<2
60 h fermentación muestra A	5.78	6.37	6.13	6.16	4.19	43	43	<2
60 h fermentación muestra B	6.29	6.48	6.95	6.93	3.4	<3	<3	<2
60 h fermentación muestra C	6.26	6.53	5.82	6.46	3.15	93	15	2.54
48 h fermentación muestra D	6.42	8.33	7.9	7.84	4.1	75	43	<2
60 h fermentación muestra D	5.27	7.37	6.71	6.93	3.18	43	23	<2

Desgraciadamente esta información es la que los productores proporcionan y únicamente permitieron el muestreo a las 48 h y 60 h de fermentación en sólo dos de las muestras, por lo que sería conveniente realizar una cinética de fermentación donde se pudiera establecer si realmente existe o no una sucesión

de los microorganismos mencionados, y corroborar si las bacterias acéticas están involucradas en la fermentación, y en que fase empiezan a desarrollarse.

Otra posible causa de la coexistencia de diversos grupos microbianos, es que los barriles donde se fermenta el tepache tienen cuando menos tres años de uso, y con la edad, tienden a hacerse más porosos, por lo que los microorganismos de fermentaciones previas quedan alojados en las cavidades resistiendo la limpieza y el restregado, lo que incrementa la carga del inóculo del tepache. Es factible que la proporción de bacterias-levaduras sea diferente entre fermentaciones y predomine alguno de estos grupos microbianos, como se ha observado en las cubas de fermentación para destilados de caña, como la Cachaça de Brasil, en donde se ha detectado un incremento en la población de bacterias (Freitas Schwan y col., 2001).

La cuenta de *Enterobacteriaceae* estuvo entre 10^3 y 10^4 ufc/ml (3.15-4.23 log ufc/ml), y la cuenta de coliformes totales y fecales fue menor a 100 nmp/ml, no existiendo diferencias significativas entre todas las muestras de tepache para ambos grupos de microorganismos (Tabla 3).

VII.1.2 Identificación de microorganismos

VII.1.2.1 Bacterias lácticas

Se obtuvieron 28 aislados de las bacterias lácticas y fueron tanto homo como heterofermentativas, predominando estas últimas en todas las muestras analizadas.

Se identificaron las especies *L. acidophilus*, *L. curvatus*, *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*, *L. salivarius* ssp. *salivarius*, y a *Weissella confusa* (Tabla 4) que se aíslan por primera vez en esta bebida. Esta última ya ha sido reportada en Pozol (masa de maíz nixtamalizada y fermentada) y es una bacteria que aparece en algunos

productos con fermentación láctica (Wacher y col., 2000). *L. acidophilus* y *L. salivarius* ssp. *salivarius* que pueden tener actividad probiótica, ya que se han reportado cepas de estas especies con esa actividad (Hopzapfel, 2001; Sanz y col., 2003).

Tabla 4. Microorganismos aislados de diferentes muestras de tepache

Microorganismos/muestras	A (48 h)	A (60 h)	B (60 h)	C (60 h)	D (48 h)	D (60 h)
Bacterias						
<i>Lactobacillus acidophilus</i>			2*			
<i>Lactobacillus salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>			1			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>				1		
<i>Lactobacillus</i> spp.	2	1	3	1	1	1
<i>Weissella confusa</i>				1		
<i>Lactococcus</i> spp.	2					2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3	1	1		1	1
<i>Pediococcus</i> spp.		1	1		1	
<i>Acetobacter</i> spp.	1	5	2	4	3	6
<i>Gluconobacter</i> sp.			2		1	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2	1	1	1	1
<i>Klebsiella</i> sp.			1			
<i>Acinetobacter</i> sp.			1			
<i>Bacillus</i> spp.	1		3	1		
<i>Micrococcus</i> sp.	1		3			
<i>Escherichia coli</i>				1		
Levaduras y mohos						
<i>Candida guilliermondii</i>			1			
<i>Candida intermedia</i>						1
<i>Candida pseudointermedia</i>					3	
<i>Candida sorbosa</i>			4			
<i>Candida sake</i>	1					1
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>			1			
<i>Kloeckera africana</i>		1			1	
<i>Kloeckera apiculata</i>			1		4	1
<i>Kloeckera apis</i>		2	3			1
<i>Kloeckera japonica</i>		1				
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1					
<i>Saccharomyces bayanus</i>				2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	1	10	4		4
<i>Penicillium</i> sp.				1		

* número de aislados

Algunas de estas especies de bacterias lácticas presentaron variaciones en su perfil bioquímico (diferencias en su desarrollo a diferentes pH, temperaturas, concentraciones de sal y utilización de diferentes compuestos) y fue difícil en muchos de los casos establecer el género, y más difícil aún ubicarlas dentro una especie. En la Tabla 4 sólo se registran aquellas especies que pudieron identificarse y que tuvieron variaciones menores con respecto a la especie tipo, por lo que se sugiere establecer o corroborar su identidad mediante técnicas moleculares, ya que se ha visto que cuando se trabaja con especies aisladas de sustratos poco estudiados se debe aplicar a las bacterias lácticas taxonomía polifásica (Rodas y col., 2005).

VII.1.2.2 Bacterias acéticas

Dentro de las bacterias acéticas de manera predominante se aisló al género *Acetobacter* con 21 aislados y sólo se obtuvieron dos de *Gluconobacter* (Tabla 4). Estas bacterias son consideradas como microorganismos que aparecen en fermentaciones láctico-alcohólicas o alcohólicas avanzadas como signo de alteración. En las muestras de tepache analizadas las cuentas de estos microorganismos son altas y además aparecen representantes de ambos géneros de bacterias acéticas, es difícil establecer si estos se encuentran en la bebida como microorganismos alteradores en fermentaciones avanzadas o forman parte de la microbiota natural de esta bebida; ya que la cuenta de estos microorganismos fue elevada aún en las muestras de 48 h (Mesas y Alegre 1999).

Otra explicación de la coexistencia de las bacterias acéticas con los otros grupos microbianos es que durante la elaboración del tepache se conserva parte de la fruta a lo largo de varias fermentaciones, por lo que es factible que las bacterias acéticas provenientes de esta fruta, puedan convivir con las bacterias lácticas y con las levaduras en el producto final en diferentes tiempos de fermentación.

VII.1.2 .3 *Enterobacteriaceae*

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* que se identificaron correspondieron a *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.* y a *Escherichia coli*. La primera estuvo presente en todas las muestras, mientras que *Klebsiella sp.* sólo en la muestra B y *E. coli* sólo en la C (Tabla 4).

La presencia de *E. coli* es un indicador de deficiencias en la calidad sanitaria, mientras que la presencia de *E. aerogenes*, aunque es un coliforme fecal puede no provenir de las heces; en el pozol se ha observado la presencia frecuente de este microorganismo y se le ha relacionado con el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico detectado en este alimento. Sin embargo, para el caso del tepache el proceso de fijación no es muy factible debido a los bajos porcentajes de proteína encontrados en la bebida, como se discute más adelante. Por lo tanto queda por explicar la presencia constante de este microorganismo en las muestras de tepache analizadas (Wacher y col. 2000).

VII.1.2.4 Levaduras

De diluciones mayores a 10^{-4} se obtuvieron 53 aislados de levaduras y un moho; de los que 23 (43.4%) correspondieron a *Saccharomyces cerevisiae*, levadura que se aisló de todas las muestras; 7 (13.7%) a *Kloeckera apis* obtenida de 3 muestras; 2 (3.77%) a *K. africana* y 6 (11.3%) a *K. apiculata*, ambas especies aisladas de 2 muestras; 4 (7.54%) a *Candida sorbosa*, 3 (5.66%) a *C. pseudointermedia* y 2 (3.77%) a *C. sake*, de una muestra; 2 (3.77%) a *S. bayanus* obtenidos de dos muestras, y de *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *K. japonica*, *Rhodotorula mucilaginosa* (1.88% c/u). Además de *Penicillium sp.* se tuvo un solo aislamiento, este moho pudo haberse encontrado por contaminación al dejarse el producto expuesto al ambiente (Tabla 4).

Se reportan por primera vez en el tepache de frutas a *Candida intermedia*, *C. pseudointermedia*, *C. sake*, *C. sorbosa*, *K. africana*, *K. apiculata*, *K. japonica* y *S. bayanus*.

El hecho de haber encontrado en las distintas muestras de tepache de un mismo tiempo de fermentación a levaduras correspondientes a fase I (especies no *Saccharomyces* de los géneros *Kloeckera* y *Candida* con mediana o baja tolerancia al alcohol) y fase II de fermentación (*Saccharomyces spp.* Con alta tolerancia al alcohol) indica una compleja ecología en la fermentación de la bebida. En estudios realizados en diferentes productos fermentados de frutas se mencionan a especies de los géneros no *Saccharomyces* como las levaduras que predominan frecuentemente en los mostos al inicio de la fermentación, ello debido a su bajo poder alcohológeno y su baja tolerancia al etanol (Mesas y Alegre, 1999).

Este grupo de levaduras además se caracteriza por producir diversos compuestos de aroma y sabor (etanol, dióxido de carbono, ácido láctico y acético y diferentes metabolitos como aldehídos, cetonas, otros ácidos y ésteres, así como compuestos sulfurados) que son importantes para dar una mayor versatilidad a las características sensoriales de las bebidas fermentadas.

Algunos géneros de fase I tienen especies que viven normalmente en la superficie de las frutas. *Rhodotorula spp.* han sido aisladas de frutos verdes en particular de piña, y *Hanseniaspora guilliermondii*, teleomorfo de *Kloeckera apis*, en frutos muy maduros y/o dañados a (Robbs y col.,1989).

Abranches y col. (2000) reportan el aislamiento frecuente de *K. africana* y de *K. apis* en guayabas y uvas; la mayor cantidad de aislados de levaduras los obtuvieron de frutos caídos rodeados de gran cantidad de insectos, por lo que concluyeron que este tipo de frutos pueden ser un hábitat importante de levaduras en ambientes tropicales.

S. cerevisiae y *S. bayanus* son levaduras alcohológenas de fase II, resistentes al etanol, cuyas poblaciones aparecen y predominan conforme avanza la fermentación, y se mantienen hasta finalizar el proceso. De manera natural estas especies no están presentes en la superficie de frutos, salvo el caso en que estén dañados o muy maduros. Es frecuente encontrarlas también asociadas a insectos o a hábitats creados por el hombre (Fleet, 2000; Engels, 2000; Jolly y Pretorius, 2000).

De manera general durante los procesos de fermentación alcohólica las levaduras de fase I son reemplazadas paulatinamente por las de fase II conforme avanza el proceso. Sin embargo, para el caso del tepache se observó la coexistencia de ambos grupos a lo largo de la fermentación.

Esto podría ser un indicador de que las muestras comerciales de tepache analizadas procedan de mezclas de procesos fermentativos incipientes y avanzados por las causas mencionadas en relación a la velocidad de venta del producto, y a las poblaciones mixtas existentes en las cavidades de los barriles de fermentación que representan una fuente de inóculo (Freitas Schwan y col., 2001; Mesas y Alegre, 1999).

Otra posible causa que explique la coexistencia de levaduras de ambas fases es que ambos estén asociados con los mismos vectores como la mosca de la fruta (*Drosophila spp.*) que a su vez se asocia con frutos con alto contenido de azúcares como la piña.

Durante el estudio se observó la presencia de estos insectos en los sitios de elaboración del tepache, y aunque de manera rutinaria las tepacheras son tapadas con manta de cielo o con tapas de madera, es probable que las moscas actúen como vectores de las levaduras mencionadas (Deak y Beuchat, 1993; Lachance, 1995).

Tabla 5. Diferencias morfo-fisiológicas y bioquímicas presentadas por aislados de *Saccharomyces cerevisiae*

Muestra	cepas	biotipos	película en GELP	cicloheximida		asimilación		%similitud		registro GenBank
				0.01%	0.10%	inulina	N-acetil-glucosamina	CBS	GenBank	
-	Bibliografía ^{1,2,3}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B (60 h)	M7, M21, M23	1	-	-	-	-	-	100	100	s/registro
C (60 h)	1H, 2H, 4H	1	-	-	-	-	-	100	-	s/secuencia
D (60 h)	T2, T4, T5	1	-	-	-	-	-	100	100	AF533068
A (48 h)	P1, P4	2	-	-	-	d	-	99	100	AF533066
A (48 h)	P2	3	-	+	+	d	-	96	-	s/secuencia
A (48 h)	P3	4	+(delgada)	-	-	d	-	98	100	AF597648
C (60 h)	3H	5	-	-	-	-	+	99	-	s/secuencia
A (60 h)	P3	6	+	-	-	-	-	99	100	AF533067
D (60 h)	T6	6	+	-	-	-	-	99	-	s/secuencia
B (60 h)	M1, M2, M6, M8, M15, M16, M17	7	-	-	-	d	t	98.3	-	s/registro

+ = positivo d = débil t = tardío GELP = caldo glucosa extracto de levadura peptona

- = negativo CBS = banco de datos Centraalbureau voor Schimmelculture, Holanda

¹ Kurtzman y Fell, 1998

² Barnett y col., 2000

³ CBS

Durante el proceso de identificación de los aislados de levaduras se presentaron los mismos problemas que con las bacterias lácticas. Algunos aislados presentaron las características distintivas de la especie, por lo que su identificación fue rápida y segura, sin tener que realizar la caracterización molecular. Pero en otras se detectaron diferencias morfo-fisiológicas y bioquímicas con respecto a la diagnosis de la especie descrita en las monografías consultadas (Kurtzman y Fell, 1998; Barnett y col., 2000 y base de datos del CBS, 2004). Con base en estas diferencias se establecieron biotipos, y de algunos de ellos se seleccionaron aislados para corroborar su identidad mediante la secuencia de bases del dominio D1/D2 de la subunidad mayor del gene 26S ADNr.

En el caso de *S. cerevisiae*, después de analizar los resultados morfo-fisiológicos, se establecieron 7 biotipos (Tabla 5) con respecto a la diagnosis de la especie referida en las monografías consultadas (Kurtzman y Fell (1998), Barnett y col. (2000) y base de datos de la CBS (2004). De los biotipos 1, 2, 4, 6 y 7 se secuenciaron 6 aislados característicos, los que presentaron un 100% de

homología con respecto a secuencias de *S. cerevisiae* registradas en el GenBank (Tabla 5). Al comparar las secuencias de estos aislados no se encontraron diferencias entre ellos, lo que indica que se trata de la misma especie y que las diferencias entre los biotipos pueden deberse a polimorfismos o a falta de expresión génica (Lachance, 1995).

En la identificación tradicional de las especies de *Hanseniaspora/Kloeckera* se presentaron problemas al seguir las claves del género de Smith (1998) y Cadez y col. (2003), ya que las características más importantes para separar las especies son: temperatura máxima de desarrollo a 37°C, fermentación de sacarosa, asimilación de 2-ceto-D-gluconato y crecimiento en 0.01% de cicloheximida.

Para el caso de los aislados de *Kloeckera* y *Hanseniaspora* obtenidos de las muestras de tepache estudiadas, todos ellos se desarrollaron a 37°C o más, algunos crecieron en presencia de cicloheximida al 0.01% y ninguno, salvo el aislado M22 fermentó sacarosa, galactosa y rafinosa. Por lo que las claves consultadas no fueron útiles para delimitar la especificidad de dichos aislados.

El hecho de que estas cepas puedan desarrollarse a temperaturas más altas puede estar relacionado a cambios en los procesos de operación de las levaduras y sus reacciones metabólicas. Los cambios en la bicapa lipídica de la membrana, en el transporte a través de la membrana y en la estructura y función de las proteínas por desarrollarse a mayor temperatura alteran el funcionamiento óptimo, pero sin llegar al grado de provocar daños irreversibles siendo tal vez ésta la razón para que las cepas presentaran desarrollo tres grados arriba de la temperatura máxima (Tabla 6).

En la Tabla 6 se reportan las especies de *Kloeckera* y *Hanseniaspora* que presentaron diferencias en las características de la diagnosis de las especies, por esta razón se agruparon en biotipos.

De ellos se seleccionaron 3 aislados para secuenciar el dominio D1/D2 del gene 26S ADNr.

Las especies del complejo *Hanseniaspora/Kloeckera* presentan pocas diferencias entre sí, lo que ha dificultado la delimitación de las diferentes especies, debido a ello, actualmente los especialistas en este género han recurrido a diversas técnicas moleculares (reasociación ADN/ADN, secuenciación de la regiones D1/D2, ITS y 5.8S y RAPD) con el fin de establecer los límites de las especies. Recientemente Cadez y col. (2003) separaron a este género en 6 grupos cada uno de los cuales representa una especie reconocida, y un séptimo grupo separado en el que incluyeron 5 aislados de *H. uvarum* que fueron indistinguibles.

Debido a que las pruebas morfo-fisiológicas y bioquímicas de identificación no permitieron la separación de todas las especies de *Hanseniaspora/Kloeckera* se realizó una combinación de pruebas fenotípicas y moleculares para identificar de forma precisa las nuevas especies de *Hanseniaspora*, pertenecientes al séptimo grupo, algunas de las cuales fueron aisladas de mosto de tequila en México.

En el análisis de algunas de las secuencias de los aislados *Hanseniaspora/Kloeckera* que se seleccionaron (M14 y R14) en este estudio se presentaron sustituciones, no obteniéndose un porcentaje de homología que permitiera corroborar la identidad de las especies de manera precisa, por ello deberá realizarse la secuenciación de la región ITS, el RAPD/PCR y el análisis de los micro y mini satélites, para que en conjunto con las pruebas tradicionales, es decir, mediante taxonomía polifásica se pueda determinar si se tienen especies nuevas.

Tabla 6. Diferencias morfo-fisiológicas y bioquímicas presentadas por los aislados de especies de *Hanseniaspora/Kloeckera*

Muestra	cepas	biotipos	identificación	película		asimilación				37°C	cicloheximida		% similitud		registro
				en GELP	ascas	maltosa	etilamina	lisina	cadaverina		0.01%	CBS	GenBank	GenBank	
A (60 h)	Bibliografía ^{1,2,3} R7	1	<i>H. valbyensis/K. japonica</i>	+	2-4 de sombrero/ hemicirculares dehiscientes	-	+	+	+	-	+	-	-	-	AF597654
			<i>K. japonica</i>		-	-	d	-	+	d	+	100	99.43		
A (60 h)	Bibliografía ^{1,2,3} R8	1	<i>H. guilliermondii/K. apis</i>	+	1-4 de sombrero/ hemicirculares dehiscientes	-	+	+/t	+/t	+	+	-	-	-	s/sequencia
			<i>K. apis</i>		-	-	d	-	+	+	+	100	-		
A (60 h)	R11	2	<i>K. apis</i>	+/a.a.	-	-	d	d	d	+	+	100	-		s/sequencia
D(60 h)	R24	3	<i>K. apis</i>	+/a.a.	-	-	+	-	+	+	+	98.3	-		s/sequencia
B (60 h)	M3, M5, M13, M14	4	<i>H. guilliermondii</i>	+/a.a.	1-4 hemicirculares, dehiscientes	-	+	+	+	+	+	100	98.92		s/registro
A (60 h)	Bibliografía ^{1,2,3} R10	1	<i>H. viniae/K. africana</i>	+/a.a.	1-2 esferoidales avemugadas, persistentes	v	+	+	+	-	-	-	-	-	s/sequencia
			<i>K. africana</i>		-	-	d	d	d	+	-	100	-		
D(48 h)	R14	2	<i>K. africana</i>	-	-	-	-	-	d	d	-	98.5	98.31		AF533065*
D(48 h)	Bibliografía ^{1,2,3} R15, R26	1	<i>H. uvarum/K. apiculata</i>	-	1-2 esferoidales avemugadas, persistentes	-	+, d/t	+, d/t	+, d/t	-	+	-	-	-	s/sequencia
			<i>K. apiculata</i>		-	-	-	-	-	+	+	99.60/99.6	-		
D(48 h)	R16, R31	2	<i>K. apiculata</i>	-	-	-	-	-	+/d	+/d	-	97.90/96.30	-		s/sequencia
D(60 h)	R43	3	<i>K. apiculata</i>	+/a.a.	-	-	-	-	+	+	+	97.9	-		s/sequencia
B (60 h)	M22	4	<i>K. apiculata</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	93.8	Fgal, Fsac, Fraf, L-ara**		s/sequencia

+ = positivo d = débil t = tardía GELP = caldo glucosa extracto de levadura peptona

¹ Kurtzman y Fell, 1998

³ CBS

- = negativo ** otras diferencias bioquímicas

CBS = banco de datos Centraalbureau voor Schimmelculture

² Barnett y col., 2000

* registrada como el anamorfo de *H. osmophila*

Para los aislamientos de *Candida* la taxonomía tradicional no fue resolutive, por lo que también hubo necesidad de recurrir a la secuenciación con el fin determinar las especies. *C. guilliermondii* fue identificada mediante la combinación de ambas taxonomías obteniendo una similitud mayor al 98% en la base de datos del CBS.

Para *C. pseudointermedia* existen aún dudas acerca de su identidad ya que su similitud es muy alta con respecto a *C. intermedia*. Tanto en lo el GenBank como en la base de datos del CBS, que combina características morfo-fisiológicas y bioquímicas con moleculares. El criterio que pudiera ser más valido para decidirse por *C. pseuintermedia* hasta este momento es su morfología colonial distintiva.

El aislado de *C. intermedia* se identificó por taxonomía tradicional sometiendo los resultados a la base de datos del CBS obteniéndose una similitud de 98.8%. Sin embargo debido a que este aislado procede de la misma muestra de la cual se obtuvieron los aislados de *C. pseudointermedia* probablemente se realice la secuencia para verificar que no pertenezca a esta última.

La identidad de *C. sorbosa* tampoco fue resolutive con la taxonomía tradicional, sin embargo, el análisis de la secuencia dominio D1/D2 del gene 26S ADNr de ambos aislados a los que se les aplicó taxonomía molecular presentaron 100% de similitud con las secuencias de *C. sorbosa* depositadas en el GenBank.

VII.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y FISICOQUÍMICAS

VII.2.1 Determinaciones de ácidos láctico y acético, de etanol, de proteína cruda, de pH, de acidez titulable y de °Brix

En el aspecto fisicoquímico, (Tabla 7) las muestras tuvieron una acidez de 0.2-0.8% expresado como ácido láctico, pH de 3.22-3.66, ácido láctico de 0.15-0.49%, ácido acético de 0.21-0.04%, etanol de 0.14-0.62% y proteína de 0.018-0.028%.

Los valores de pH obtenidos no se pudieron relacionar mucho del grado de fermentación de la bebida ya que las frutas utilizadas como materias primas son productos ácidos que pueden tener un pH desde 5.5 hasta 3.0 o más bajo, dependiendo de la madurez de cada una de las frutas y algunos otros factores como el lugar de cultivo, variedad etc. Cabe hacer mención que la cantidad de fruta que se adiciona al tepache es baja y se diluye varias veces antes de que se tenga lista la bebida. No se tiene certeza de a que pH se inician las fermentaciones pero es muy probable que haya una disminución de uno o dos puntos a valores de hasta 3.1, con el proceso de fermentación del tepache debido principalmente a la acción de las bacterias lácticas y tal vez de las acéticas. En la tabla 8 se observa que los valores de pH fueron muy semejantes para tres de las bebidas y sólo la bebida C es menos ácida tal vez porque sea una bebida menos fermentada, sin embargo no presentaron diferencias significativas (Hodgson y Hodgson, 1993).

Tabla 7. Determinaciones físicoquímicas y bioquímicas de muestras de tepache

Muestra	pH	%					° Brix
		acidez	ácido láctico	ácido acético	etanol	proteína ⁺	
A (60 h)	3.10	0.074	0.150	0.040	0.237	0.023	11.00
B (60 h)	3.18	0.083	0.487*	0.043	0.734*	0.026	10.86
C (60 h)	3.44	0.050*	0.138	ND**	0.380	0.021	10.47
D (60 h)	3.25	0.100	0.164	0.023	0.201	0.029	12.43*

* diferencias significativas $\alpha = 0.05$

⁺ N x 6.25

**no detectable

Los porcentajes de acidez y las concentraciones de ácido láctico, ácido acético y etanol son bajos y no se relacionan con la cantidad de bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras presentes en las muestras analizadas, más bien se explican por el proceso de dilución al que son sometidos las muestras de producto final, antes de la venta. El contenido de alcohol es bastante bajo en todos los casos mucho menor al 1%, sólo la muestra B fue estadísticamente diferente y presentó valores cercanos ese 1%. Fue la que mayor cantidad de ácido láctico y de etanol tuvo por lo que se puede decir que es en promedio una bebida más fermentada tanto con fermentación láctica como con alcohólica.

Rubio y col. (1993) en su estudio químico y microbiológico de tepache de tibicos que es un producto similar al de este trabajo, reportan también poblaciones altas de microorganismos con cantidades bajas de etanol (menor también a 1%) y de ácido láctico (entre 0.5 y 0.7%) y en ese estudio no se hicieron diluciones del producto como se acostumbra para el tepache comercial.

La cantidad de proteína encontrada es mínima y tal vez sólo sirva como precursor en el desarrollo de compuestos volátiles que den sabor y aroma a la bebida.

Se observa poca variación en los °Brix de la bebida lo que refleja que hay una adición de azúcar constante antes del punto de venta, sólo la bebida D es la más dulce y significativamente diferente a las otras 3 (Tabla 7).

Los valores promedio de las determinaciones fisicoquímicas y bioquímicas pueden ser un primer parámetro de calidad para la estandarización del proceso o el desarrollo de la norma de esta bebida.

VII.2.2 Identificación de compuestos volátiles

En los cromatogramas obtenidos de las muestras comerciales de tepache analizadas se observaron más de 100 compuestos lo que muestra un perfil complejo en estas bebidas (Figura 2) (Tabla 8).

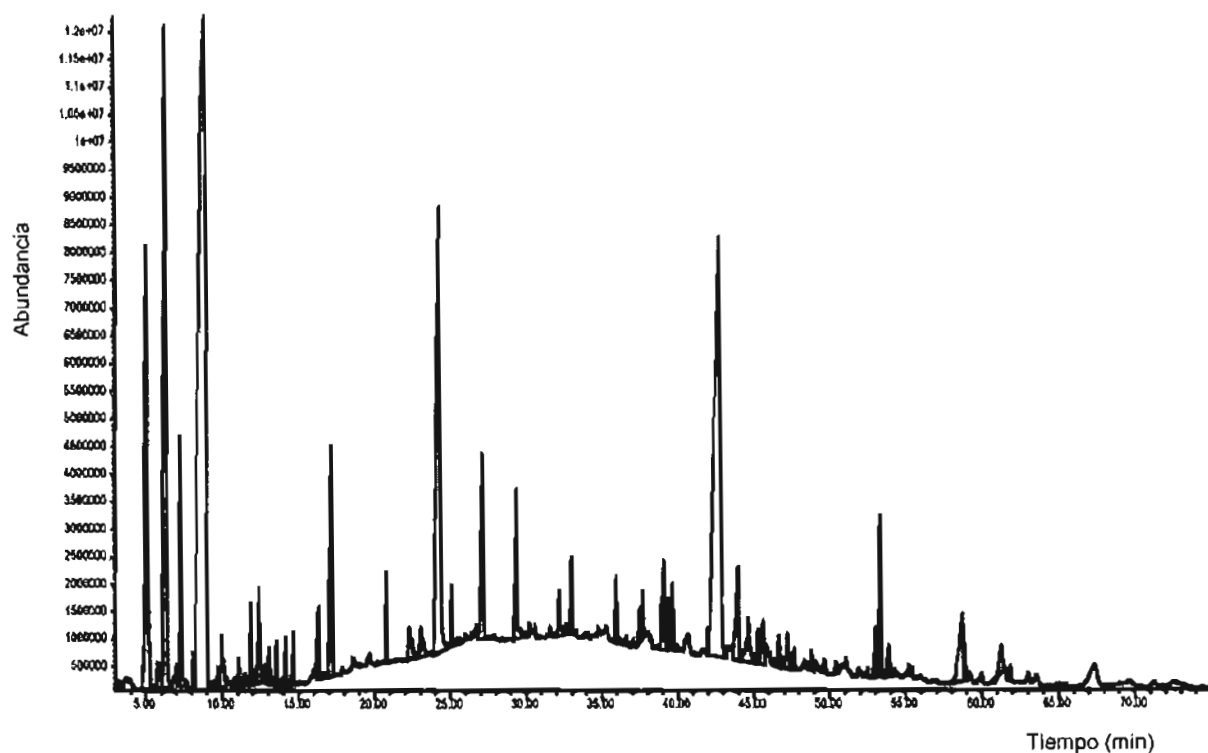


Figura 2. Cromatograma típico de compuestos volátiles de una muestra de tepache de 60 h de fermentación.

Los compuestos más abundantes fueron ácidos orgánicos, alcoholes, furanos, terpenos, cetonas, ésteres, derivados de aminoácidos y compuestos fenólicos; seguidos de aldehídos, derivados de benceno, alquenos, lactonas y alcanos.

Tabla 8. Determinación de compuestos volátiles en diferentes muestras de tepache

IK	t _R		A	B	C	D
ALCOHOLES						
1073	3.5	1-Propanol 2-metil	x			x
1105	3.89	1-Butanol 3-metil-acetato	x	x	x	x
1199	4.96	1 Butanol -3- metil-	x	x	x	x
1480	10.8	1-Hexanol, 2 etil			x	x
1516	11.9	2,3-Butanediol diacetato			x	x
1538	12.5	1.6-Octadien-3-ol. 3.7-dimetil		x	x	
1545	12.7	1-Octanol			x	x
1578	13.8	3-Cyclohexen-1-ol.4 metil-1-(1-metil etil)-R	x	x		x
1746	19.5	6-Octen-1-ol. 3-7-dimetil. [R]-		x	x	x
1776	20.6	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimetil, (Z)	x	x	x	x
1846	22.9	Benzil alcohol		x		
1884	24.2	Fenil etil alcohol	x	x	x	x
2088	30.9	Ciclo hexanometanol.4-hidroxi- α - α -4-trimetil			x	
2354	40	Hexadecen-1-ol. Trans-9-		x	x	x
2553	44.7	1-Hexadecanol		x		
ÁCIDOS ORGÁNICOS						
1448	9.88	Ácido acético	x	x	x	x
1529	12.3	Ácido propanoico	x	x	x	x
1610	14.9	Ácido butanoico	x	x	x	x
1650	16.2	Ácido butanoico-2-metil	x	x	x	x
1731	19	Ácido pentanoico	x	x	x	
1826	22.3	Ácido hexanoico			x	x
1936	26	Ácido heptanoico	x	x	x	x
2041	29.4	Ácido octanoico	x	x	x	x
2149	32.7	Ácido nonanoico	x	x	x	x
2256	36	Ácido n-decanoico	x	x	x	x
2311	37.7	Ácido undecilénico	x	x	x	x
2459	42.1	Ácido dodecanoico	x	x	x	x
2515	43.7	Ácido propanedioco fenil	x	x	x	
2636	48	Ácido tetradecanoico	x	x	x	x
2645	48.5	Ácido oleico	x	x	x	
2724	53.1	Ácido n-hexadecanoico		x	x	x
2819	59.1	Ácido 9-hexadecenoico	x	x	x	x
2831	60	Ácido octadecanoico	x	x	x	x
ALCANOS						
1575	13.7	Ciclopropano. Pentil		x		
ALQUENOS						
1239	5.52	1-Deceno			x	
1435	9.55	1- Tetradeceno		x	x	x
1976	27.3	1-Ciclohexeno 1-metanol.4-(1.metil etenil)	x			

Tabla 8. Continuación

IK	t _R	compuesto	A	B	C	D
CETONAS						
1248	5.66	3-Octanona	x	x		
1279	6.16	2-Butanona.3 hidroxi	x	x	x	x
1490	11.1	Etanona.1-(2-furanil)-		x	x	x
2121	31.8	9-Heptadecanona		x	x	x
ALDEHÍDOS						
1437	9.62	Pentanal		x		
1480	10.9	Decanal	x	x		x
1838	22.6	E-15-Heptadecanal		x		
ÉSTERES						
1335	7.21	Ácido propanoico 2-hidroxi- etil ester (S)	x	x	x	x
1783	20.8	Ácido acético 2 fenil etil ester	x	x	x	x
FENOLES						
1922	25.5	Fenol-2-metoxi-4-metil		x	x	x
1993	27.9	Fenol-4-etil-2-metoxi	x	x	x	x
2075	30.4	Fenol-2-metoxi-4-propil		x		
2114	31.6	2.4-Difenil-4-metil-2[E]-penteno				x
2143	32.5	Fenol,4 etil			x	
2300	37.4	Fenol. 4-(2-propenil)-	x	x	x	
2550	44.6	O-Hidroxi-bifenil	x	x	x	x
2612	46.7	Fenol. O-($\alpha\alpha$ -dimetil benzil)-			x	x
2795	57.6	Fenol.3.4.5-trimetoxi	x	x		
2813	58.8	Fenol.2-(1.1-dimetiletil)-4-(1-metil-1-feniletil)	x	x	x	x
FURANOS						
1593	14.3	2 (3H)- Furanona, dihidro-5-metil		x	x	x
1643	16	2 Furanmetanol		x	x	x
1652	16.3	2(5H)-Furanona, 5-metil			x	x
2015	28.6	2.5-Dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona	x	x		
2467	42.3	2- Furancarboxaldehído, 5 (hidroximetil)	x		x	x
2687	50.9	2[3H]-Furanona. 5-etoxidihidro		x	x	x
TERPENOS						
1182	4.74	D-Limoneno		x	x	x
1689	17.6	(+)- α -Terpineol	x	x	x	x
1936	25.9	Maltol			x	
1965	26.9	p-Menta-1 (7).8(10)-dien-9-ol	x	x		
2292	37.1	α -Hidroxi linalool	x	x		
BENCENOS						
2137	32.3	Ácido Benzoico 4-etoxi-etil-ester	x		x	x
2403	40.7	Ácido benzoico	x	x	x	x
2761	55.4	Benzen etanol-4-hidroxi				x
LACTONAS						
1600	14.6	Butirolactona	x	x	x	x
DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS						
2858	61.9	N-Acetil tiramina	x	x	x	x

Algunos de los compuestos aparecieron en todas las bebidas siendo los ácidos orgánicos y los alcoholes los más frecuentes. Varios de los compuestos procedieron de la materia prima, ya que se han reportado algunos de ellos en jugos de piña y naranja, otros se detectaron en todas las bebidas, pero varios son únicos en alguna de las muestras. Muchos se derivan de la fermentación y por lo tanto se relacionan con diferentes microorganismos que intervienen en el proceso.

VII.2.2.1 Alcoholes

Dentro de los alcoholes los compuestos encontrados en todas las bebidas en cantidades relativas más altas fueron el feniletil alcohol, el 3-metil-1-butanol, y el 1-Butanol 3-metil-acetato (Tabla 8). Los tres son productos típicos de los procesos fermentativos y han sido reportados en vinos tintos, blancos, cerveza, sidra, tequila, entre otros, proporcionando algunas notas dulces en la mayoría de las bebidas alcohólicas, y son en tequila dos de los compuestos odoríferos más potentes (López, 1999; Mancilla-Margalli y López, 2002). El segundo también se ha detectado en piña (Hodgson y Hodgson, 1993). En la elaboración de té Kombutcha a partir de té negro fermentado se han obtenido diversos compuestos que se detectaron en algunas de las muestras de tepache analizadas estos son principalmente alcoholes. En la elaboración de té se utilizan principalmente levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*) y bacterias acéticas (*Acetobacter xylinum*) y se genera un producto con características aromáticas parecidas a la sidra y que de alguna manera se asemeja al tepache, estos compuestos aparecen en el transcurso de la fermentación. Muchos de los compuestos que se producen durante la fermentación son típicos de procesos que involucran el desarrollo de levaduras en las fases iniciales, allí se han detectado incrementos en la producción de feniletil alcohol y el 3-metilbutanol y acetoína, además, se ha encontrado 2,3 butanediol (Berger, 1995). En vino se han detectado alcoholes superiores como resultado también de la acción de levaduras como 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 2-feniletanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y 1-octanol. Algunos de los cuales se derivan de la degradación de

aminoácidos. De estos compuestos el 3-metil-1-butanol está en todas las muestras de tepache analizadas, el 2-metil-1-propanol está en las muestras A y D y el 1-octanol está en las C y D como resultado de la acción de las levaduras que fermentan al tepache (Scharpf y col. 1986).

Algunos de estos compuestos también se han encontrado en vinagres que proceden de fermentaciones alcohólicas como son los vinagres españoles de vino y de vino sherry, este último se distingue por un desarrollo secundario de levaduras que producen película, en ellos también se reportó la presencia de 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Blanch y col., 1992).

Como se observa en la Figuras 3 y 4 los compuestos que aparecieron en mayor porcentaje fueron los alcoholes, siendo el feniletil alcohol el que tuvo la mayor proporción relativa de todos los compuestos ya que ocupó más del 23% de los compuestos mayoritarios que aparecieron en las 4 bebidas analizadas, y contribuyó de manera esencial a que los alcoholes fueran el grupo mayoritario. En el tequila este alcohol es uno de los componentes de mayor proporción responsable del aroma junto con el ácido acético y algunos ácidos orgánicos que aparecieron en todas las muestras de tepache analizadas, este compuesto proporcionó principalmente un aroma afrutado a las bebidas fermentadas y en el tequila se ha visto que aporta también un aroma a madera (López, 1999).

En la fermentación vínica se han detectado gran cantidad de moléculas activas en la fracción volátil del vino tinto en donde los alcoholes representan a los componentes que se encuentran en mayor cantidad (Ferreira y col., 1998), en el tepache se observó este mismo comportamiento.

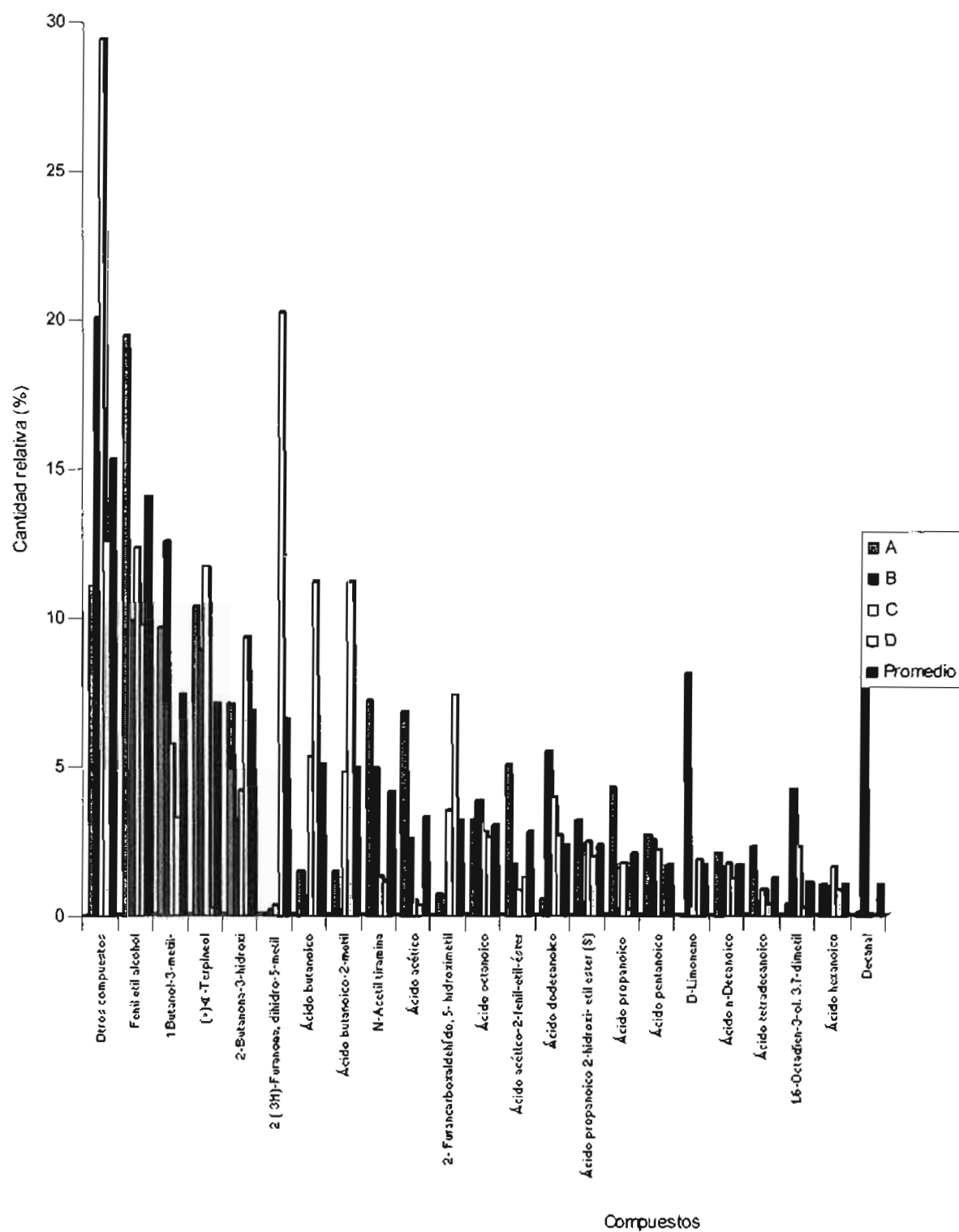


Figura 3. Cantidad relativa de compuestos volátiles que aparecen en muestras de tepache.

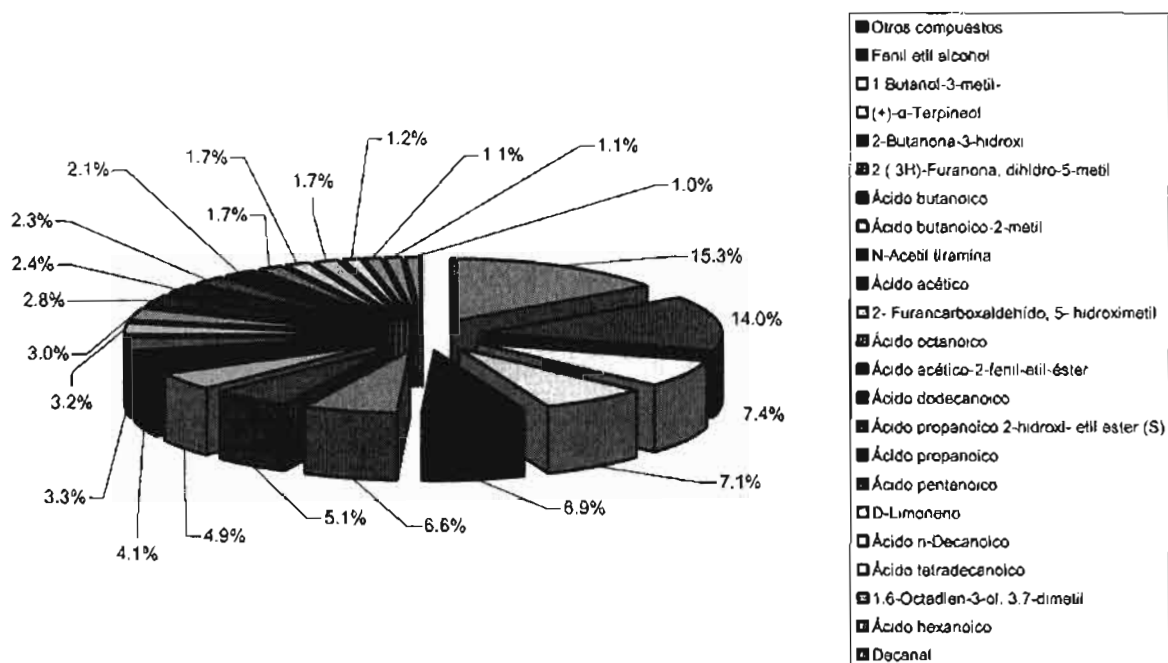


Figura 4. Porcentaje de compuestos volátiles presentes en muestras de tepache.

VII.2.2.2 Ácidos grasos

Se ha observado que algunas levaduras producen cantidades variables de ácidos grasos libres en vino, entre ellos están los ácidos acético, butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico, algunos de los cuales fueron detectados en varias de las bebidas analizadas y otros sólo en alguna de ellas (Fleet, 1997).

Se ha visto en particular que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de liberar a lo largo de la fermentación ácidos grasos de cadena media con cualidades aromáticas en bebidas fermentadas, éstos se van acumulando y llegan a ser aromas importantes en fermentaciones lentas. Estos ácidos pueden estar en dos formas, ya sea libres o ligados como etil ésteres. Libres pueden proceder de la materia prima, pero normalmente se producen durante la fermentación alcohólica. Se han encontrado ácidos grasos de 6 a 18 carbonos en ambas formas como los más frecuentes en muestras de vino tinto (Gallart y col., 1997).

De los anteriores los más comunes son: hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico, los dos primeros han sido encontrados casi siempre en medios de cultivo. En el tepache fueron detectados en todas las bebidas analizadas los ácidos propanoico, butanoico, heptanoico, octanoico, noanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico y octadecanoico y otros en algunas de ellas (Tabla 8). El microorganismo más frecuentemente aislado del tepache fue *S. cerevisiae*, por lo que es probable que la formación de estos compuestos en el tepache pueda ser atribuida a esta levadura, aunque también es factible que hayan intervenido otras especies de levaduras (Gallart y col., 1997; Bardi y col., 1998).

Al igual que algunos de los alcoholes encontrados en el tepache, varios de los ácidos también han sido reportados en vinagres de vino y de vino sherry, allí se han detectado ácidos propanoico, butanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico y decanoico. Este proceso lleva la participación de levaduras y bacterias acéticas que están también involucradas en la elaboración de tepache y es muy probable que sean estos dos grupos de microorganismos los responsables de producir estas sustancias en ambos productos (Blanch y col., 1992).

Varios de estos ácidos grasos volátiles (C_2 - C_{10}) también pudieron ser generados por algunas de las bacterias lácticas, ya que se ha visto que estas bacterias los producen cuando se utilizan como iniciadores y son responsables del aroma del queso cheddar (Scharpf y col. 1995). También los ácidos grasos que se generan

como resultado de procesos fermentativos dan en conjunto aromas característicos de fermentación como se ha visto en vinos tintos argentinos (Iris, 2004)

De la variedad de ácidos grasos encontrados en el tepache, las proporciones relativas de estos compuestos fueron bastante altas, y ocuparon el primer lugar dentro de los compuestos volátiles más abundantes en los tepaches analizados según se muestra en la Figura 5. Muchos se reportaron en todas las muestras y otros sólo en algunas.

En general los ácidos grasos de cadena más corta estuvieron en mayor cantidad relativa en las muestras de tepache y fueron disminuyendo conforme la cadena que los conformaba era más grande. Las bebidas B, C y D tuvieron un comportamiento diferente en cuanto a la proporción de ácidos grasos, siendo importante señalar en particular, que en la bebida D el ácido butanoico fue el más abundante. Todos los ácidos en esta bebida aparecieron en mayor cantidad relativa superando incluso a la de los alcoholes (Figura 5). Así, los ácidos grasos en conjunto con los alcoholes generan en el tepache aromas muy marcados de frutas y de productos fermentados (Gallart y col., 1997; Iris, 2004).

VII.2.2.3 Ésteres

Algunos ésteres de ácidos grasos han sido detectados en piña y son de los principales compuestos que le dan a este fruto un aroma afrutado característico. En todas las bebidas de tepache analizadas se encontraron sólo dos ésteres de ácidos grasos y estos pudieran provenir de la piña (Berger, 1991). Los dos compuestos encontrados en el tepache también se han reportado en vinagres de vinos y de vino sherry (Blanch y col., 1992).

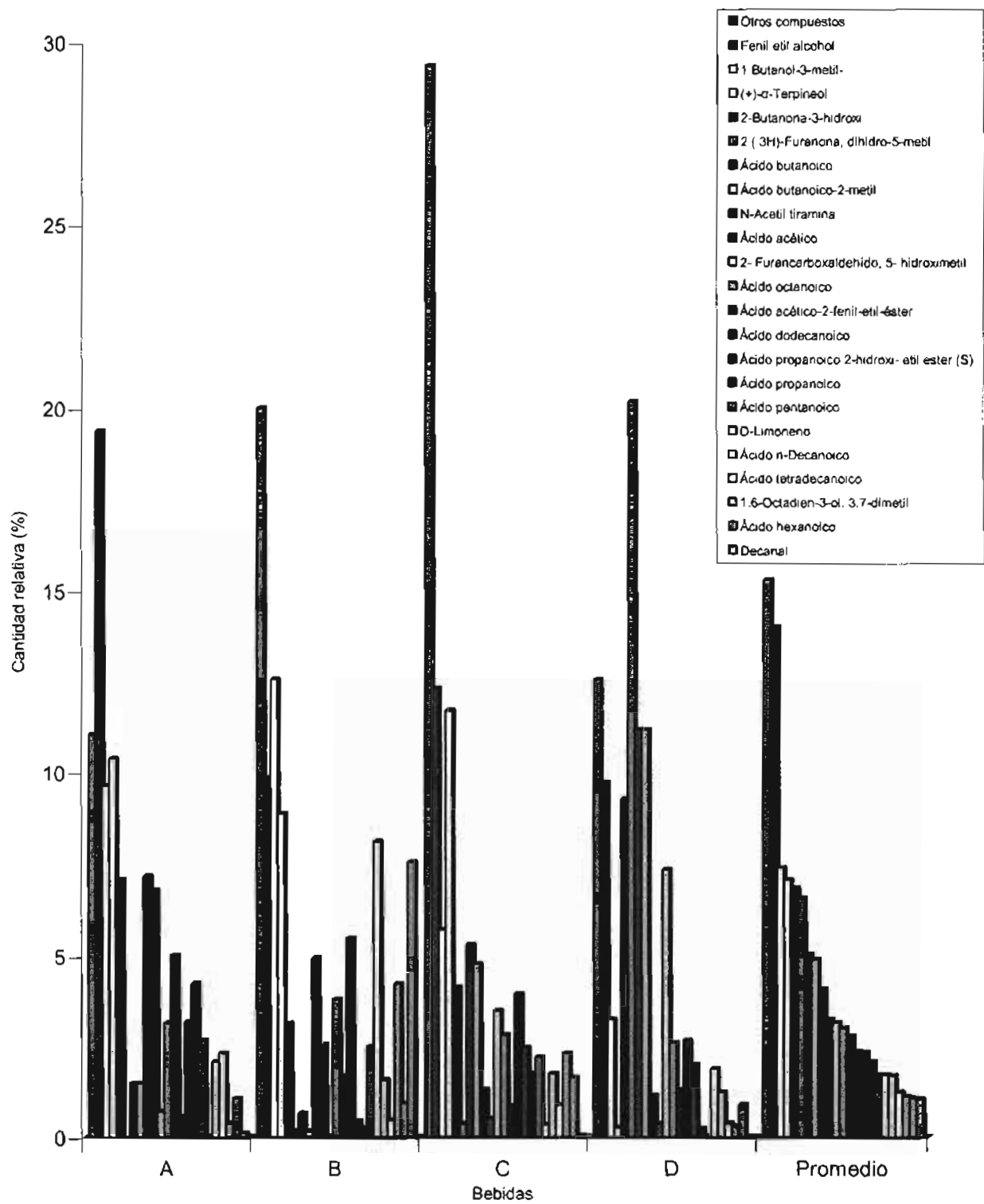


Figura 5. Cantidad relativa de compuestos volátiles más abundantes en muestras de tepache para cada bebida.

Los ésteres pudieron provenir también de cambios que sufren los ácidos grasos como resultado de la fermentación y pueden generar sabores afrutados. En el caso del tepache los dos ésteres son derivados de ácidos como el acético y el propiónico, estos dos compuestos estuvieron en proporciones altas en todas las muestras de tepache y pudieron generarse como parte de la acción de las levaduras (Figuras 3, 4, 5 y 6). Cabe aclarar que estos fueron los únicos ésteres que se encontraron, tal vez por lo incipiente de la fermentación, ya que se ha visto que la generación de ésteres se da como consecuencia de cambios metabólicos que generan las levaduras en fermentaciones prolongadas como la del vino (Gallart y col. 1997).

En las diferentes muestras analizadas no se encontró acetaldehído, compuesto precursor en la formación de etanol. Se ha visto sobre todo en levaduras apiculadas que puede haber cepas que no produzcan grandes cantidades de este compuesto y tengan una mayor actividad etanólica, este puede ser el caso de estas bebidas donde existen grandes cantidades de levaduras apiculadas. Otro factor importante en la falta de acetaldehído pudo deberse a la presencia de bacterias lácticas principalmente especies de *Leuconostoc* que convierten el acetaldehído a etanol evitando así su presencia, aunque esto sólo ha sido observado en yogurt (Romano y col., 1997; Johnson y Steele, 1997).

VII.2.2.4 Alcanos

Sólo se detectó un alcano en la bebida B, (Tabla 9), se ha visto que los alcanos aparecen en diversos productos como resultado de la oxidación de lípidos junto a una amplia variedad de otros compuestos incluidos aldehídos, cetonas y alcoholes (Carunchia Whetstine y col., 2003).

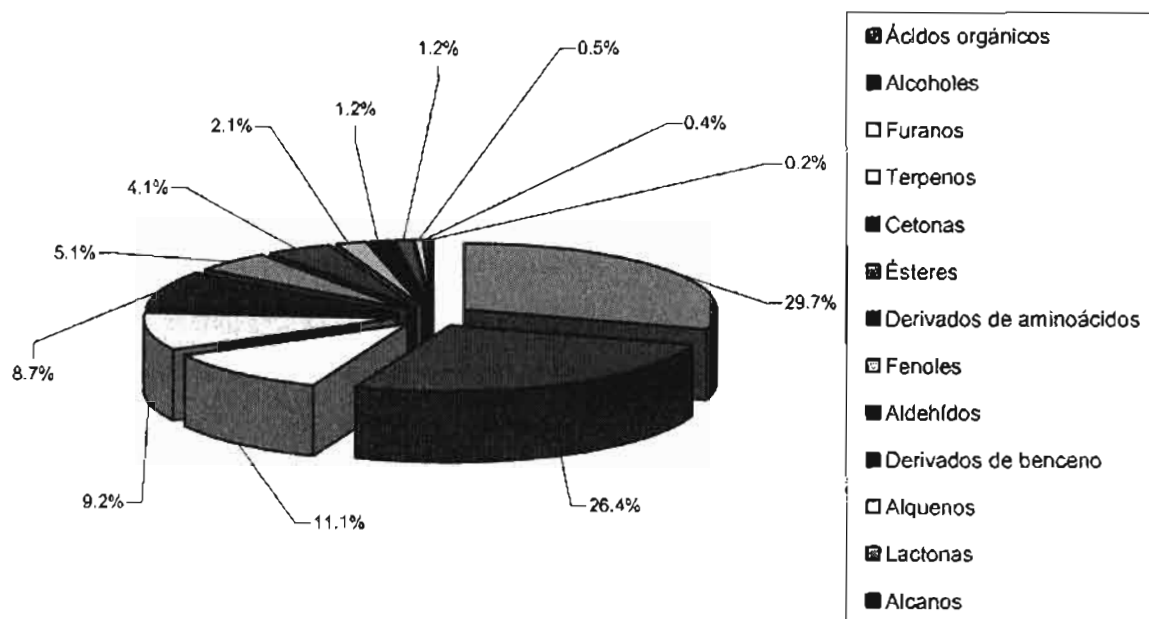


Figura 6. Porcentaje de grupos de compuestos volátiles presentes muestras de tepache.

VII.2.2.5 Fenoles

Todos los compuestos fenólicos encontrados en las diferentes muestras fueron específicos para cada bebida (Tabla 9) excepto el 4-etil-2metoxi-fenil, el O-Hidroxibifenil y el Fenol.2-(1.1-dimetiletil)-4-(1-metil-1-feniletil) que aparecieron en cantidades relativas altas en todas las bebidas analizadas (Figuras 3, 4 y 5). El primero estuvo en cantidades semejantes en las 4 bebidas. Otros compuestos fenólicos aparecieron en proporciones menores y estuvieron en una, en dos y hasta en tres de las muestras.

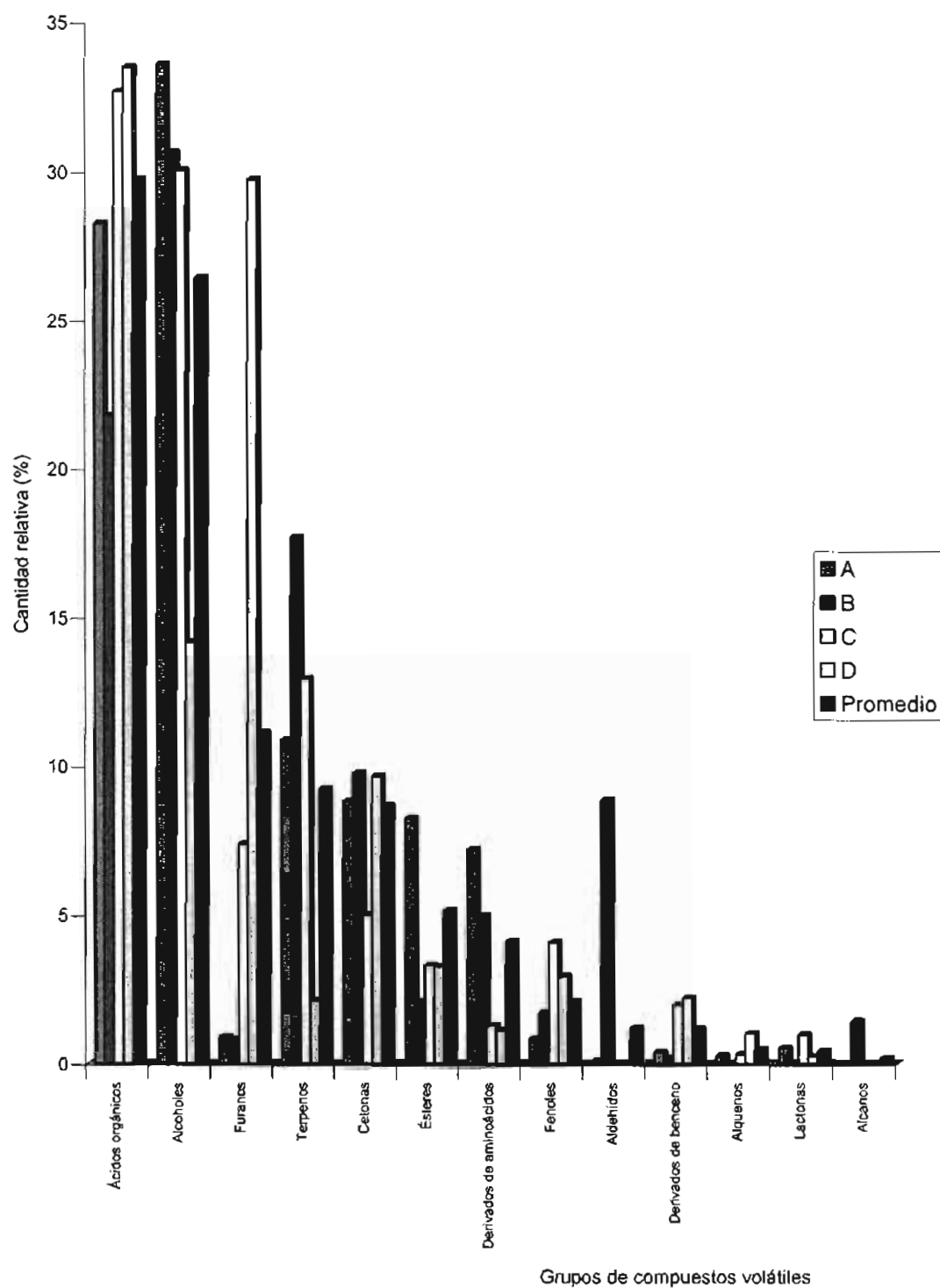


Figura 7. Cantidad relativa de grupos de compuestos volátiles que aparecen en muestras de tepache.

El 4-etil-fenol y otros compuestos fenólicos han sido reportados en vinos tintos e imparten un aroma a cuero sudado, a establo, a granja o a especias y en concentraciones bajas proporcionan notas agradables, pero en exceso pueden tener un efecto negativo en las bebidas fermentadas. Este compuesto pudo haber aparecido como resultado de la elaboración del tepache en barriles, sobre todo si se elaboró en barriles viejos, también pudo haber estado asociado a la presencia de la levadura *Brettanomyces/Dekkera*. Este microorganismo es capaz de producir aromas de fenol. Sin embargo, este microorganismo no fue aislado de las muestras analizadas, a pesar de lo anterior, es muy factible que pueda esta levadura estar en los barriles y no haya sido detectada (Licker y col., 1999)

VII.2.2.6 Furanos

Los furanos fueron otros de los compuestos que aparecieron con bastante diversidad aunque en A y B estuvieron en cantidades relativas mucho menores que en las otras dos bebidas (Tablas 7 y 8). Es muy probable que aparezcan ya que a la bebida se le adiciona azúcar quemada, y los furanos son productos típicos de reacciones de caramelización procedentes de mono y disacáridos deshidratados, compuestos heterocíclicos simples muy comunes en las reacciones con azúcares simples, como es el caso de la sacarosa. Otros compuestos derivados de furanos pueden estar asociados a reacciones de Maillard y también pudieron detectarse en la bebida. Estos compuestos están asociados a la degradación e interconversión de compuestos que contienen grupos amino, el dihidro-5-metil-2(3H)-furanona se ha reportado como parte de las reacciones de Maillard que se dan en los exudados de *Agave tequilana* Weber var. azul durante la cocción de las piñas para la producción de tequila, este compuesto apareció en las bebidas B, C y D (Mancilla-Margalli y López, 2002).

B, C y D fueron de las bebidas a las que se adiciona azúcar quemada y este compuesto puede provenir de las reacciones de caramelización o bien pudo ser que en el proceso se generen como resultado de la interacción entre los

compuestos aminados y los azúcares que hay en las frutas. Otros como el furaneol (2-5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona) ha sido reportado en jugo de piña, este compuesto fue encontrado en las bebidas A y B, se sabe que por la información obtenida con los productores que éstas pueden tener un poco más de fruta (Hodgson y Hodgson, 1993; Mancilla-Margalli y López, 2002).

VII.2.2.7 Terpenos

El (+)- α -terpineol fue uno de los compuestos más altos en cantidad relativa y se presentó en todas las bebidas (Figuras 3 a 8). El limoneno se detectó en tres de las muestras de tepache, tal vez porque los productores declaran que tiene una mayor cantidad de naranja o por la forma en que se adiciona la naranja con todo y su cáscara, donde se exprime el jugo y después se pone en el agua. Este compuesto al no ser un soluble en agua y quizás por haberse exprimido en exceso la naranja se pudo haber presentado en particular en esta bebida, ya que este compuesto ocupa casi el 95% del aceite esencial extraído de la cáscara de esta fruta (Shaw, 1991).

VII.2.2.8 Lactonas

Otro compuesto que apareció en las cuatro bebidas fue la butirolactona (Figuras 3 a 8). Este se ha reportado como un producto de la degradación de fructosa, dado que en este tipo de fermentación el principal ingrediente, después del azúcar de caña, es la fructosa procedente de la piña y la naranja que se utilizan como sustrato de fermentación, es muy factible que se haya generado como parte del proceso de fermentación. (Mancilla-Margalli y López, 2002).

VII.2.2.9 Derivados de aminoácidos

El único derivado de aminoácido que se encontró en el tepache fue la N-acetil-tiramina que estuvo presente en proporciones relativamente altas en las cuatro bebidas analizadas (Figuras 3 a 8). Esta amina biogénica es producida por bacterias lácticas y es un producto de fermentación que se genera por descarboxilación de aminoácidos, en particular para este compuesto, de la tirosina. En diversos productos fermentados se ha encontrado a esta y otras aminas biogénicas. En las muestras de tepache estuvo en proporciones relativamente altas ocupando el 4º lugar entre los compuestos volátiles más abundantes, la proporción varió entre las bebidas, siendo A la que tuvo más de este compuesto.

Se ha visto que estas aminas aparecen de forma general en productos fermentados, aunque de forma limitada por ser una bebida alcohólica. Se puede decir que las bacterias lácticas fueron las que produjeron la N-acetil-tiramina. Mediante la selección de ciertas bacterias lácticas se podría controlar la producción de estas aminas, ya que en niveles altos no son deseables en los productos fermentados porque pueden producir dolores de cabeza, dificultad para respirar, palpitaciones o reacciones alérgicas (Lonvaud-Funel, 2001).

Hubo gran cantidad de compuestos como alcoholes, ácidos grasos, alcanos, alquenos, fenoles, aldehídos y derivados de benceno que aparecieron en proporciones menores y que aparecieron en una o dos de las bebidas, lo que en conjunto hacen que cada tepache tenga un perfil distintivo propio. Esto pudo deberse al tipo de proceso de fermentación, la cantidad y proporción de materias primas, los microorganismos involucrados y como se comportan éstos a lo largo de la fermentación. Todo lo anterior genera una combinación particular de aromas que son característicos en todos los tepaches analizados y otros que dan un toque particular a cada producto ya que pueden generar un sinergismo de multicomponentes (López, 1999).

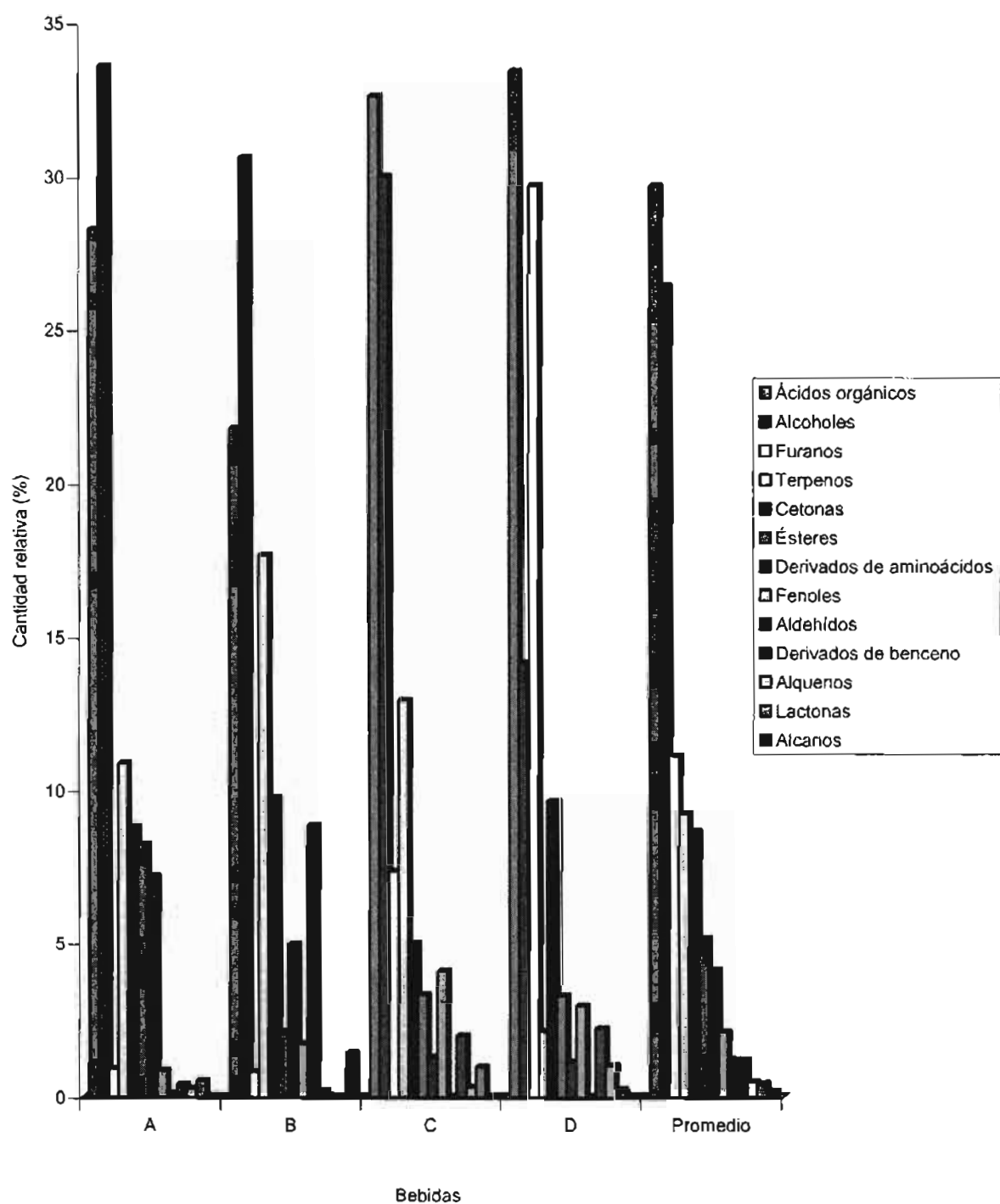


Figura 8. Cantidad relativa de grupos de compuestos volátiles que aparecen en cada bebida.

VII.3 EVALUACIÓN SENSORIAL

VII.3.1 Principales atributos sensoriales del tepache percibidos por consumidores

VII.3.1.1 Cuestionario filtro

Se encontró una gran diversidad de edades entre los consumidores, en un intervalo entre 8 y 67 años de edad, con un 72% de personas menores de 32 años (Figura 9). Los resultados de frecuencia de consumo indicaron que el 34% de los entrevistados consumía tepache al menos una vez por semana, 19% cada semana y 47 % una vez al mes (Figura 10). La mayoría de los consumidores expresó que les gustaría continuar con el consumo de tepache, y que podían incrementar su consumo si hubiera mayor disponibilidad de la bebida.

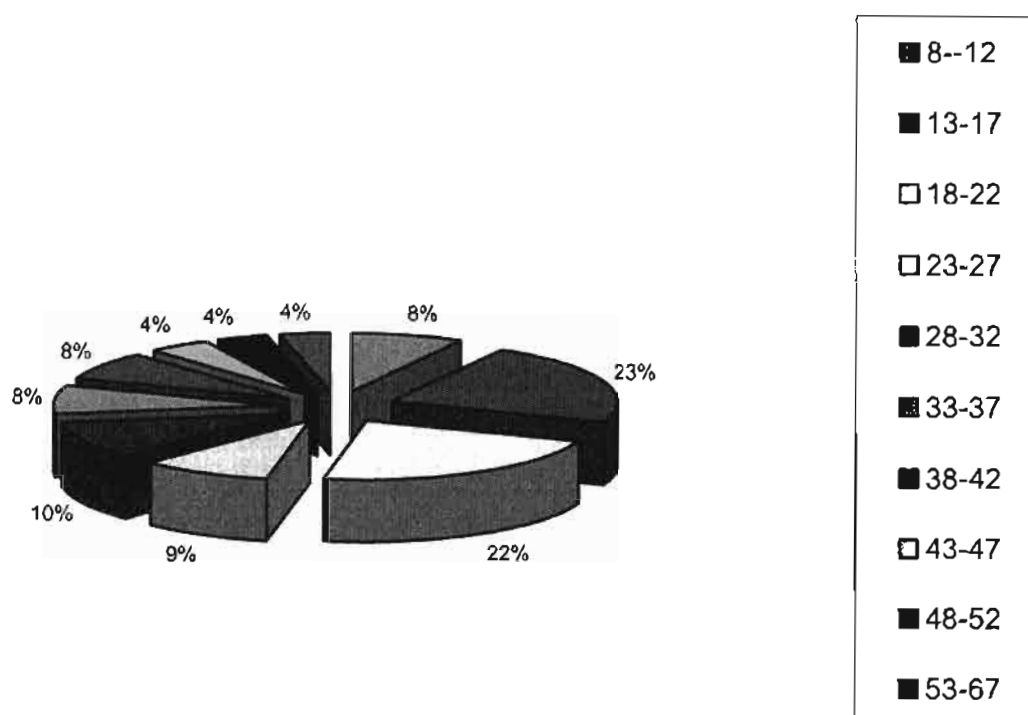


Figura 9. Frecuencia etárea de consumidores de tepache.

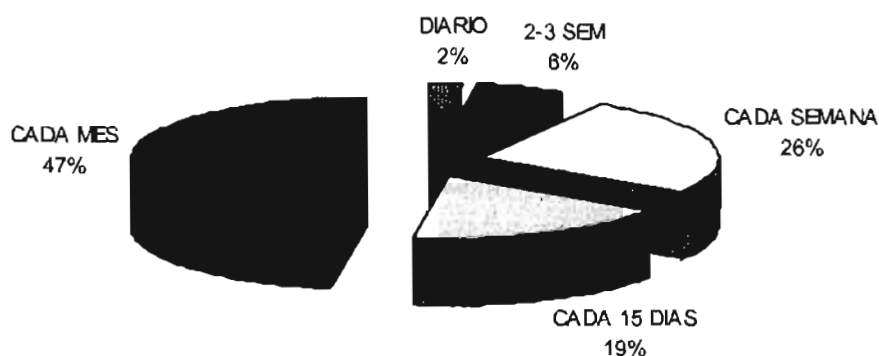


Figura 10. Frecuencia de consumo de tepache.

La bebida es consumida por personas en un amplio espectro de edades y es bien apreciada por los jóvenes; lo que incrementa las posibilidades de aumentar el mercado de consumo.

VII.3.1.2 Prueba monádica secuencial de aceptación con consumidores

El análisis de varianza de las cuatro muestras demostró que no existen diferencias significativas entre las repeticiones o los consumidores ($p < 0.05$). Sin embargo, los consumidores notaron diferencias significativas entre las muestras de tepache ($p < 0.05$), siendo la muestra D la que obtuvo el mayor promedio de evaluación de los diferentes atributos y C el más bajo (Figura 11). Estos resultados son consistentes con los promedios de las diferentes escalas, en donde la muestra D obtuvo el mejor promedio para la primera impresión (6.92 ± 1.50), gusto global (8.12 ± 1.33) y para los atributos de apariencia (3.94 ± 0.73), olor (3.64 ± 0.80) sabor (3.79 ± 0.83) y relación dulzor/acidez (3.35 ± 0.77). El único atributo de la muestra D que no tuvo el más alto promedio fue el de intensidad de sabor (2.94 ± 0.78).

Cuando se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) a los atributos sensoriales se vió que sólo la intensidad de sabor permitió discriminar el proceso de manufactura. Las muestras A y B obtenidas por un proceso de fermentación en tres pasos fueron percibidas como más fuertes y de sabor más fermentado que las muestras C y D elaboradas mediante dos pasos de fermentación. Probablemente debido a la adición de más azúcar y fruta después de 24 horas de fermentación que se hace en las dos primeras.

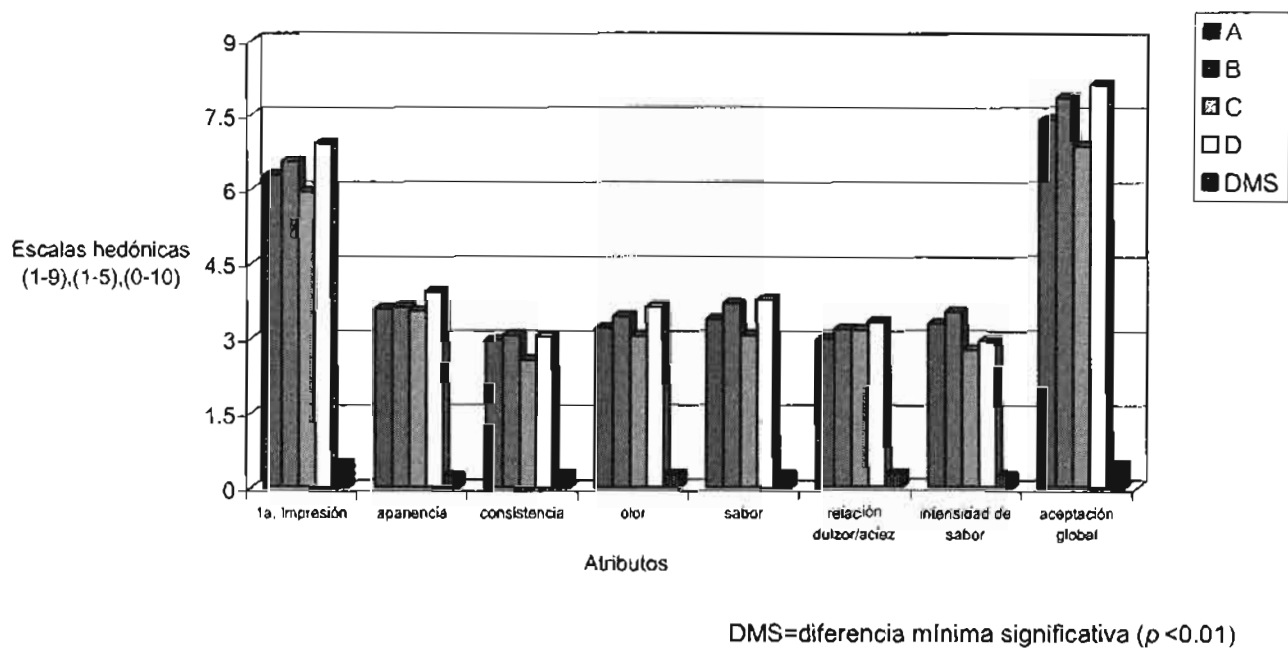


Figura 11. Evaluación monádica de atributos en diferentes muestras de tepache.

En contra de todas las expectativas, la relación dulzor/acidez mostró muy poca variación. Esto se debe tal vez a la costumbre de los productores de compensar el alto grado de fermentación con la adición de azúcar, con el objeto de disminuir la sensación de acidez, ya que tienen amplia experiencia para balancear el sabor de su bebida. Algunos autores mencionan que en algunas bebidas se percibe menos la sensación de acidez cuando los productos se hacen más dulces (Stampanoni, 1993; Duran y Costell, 1999).

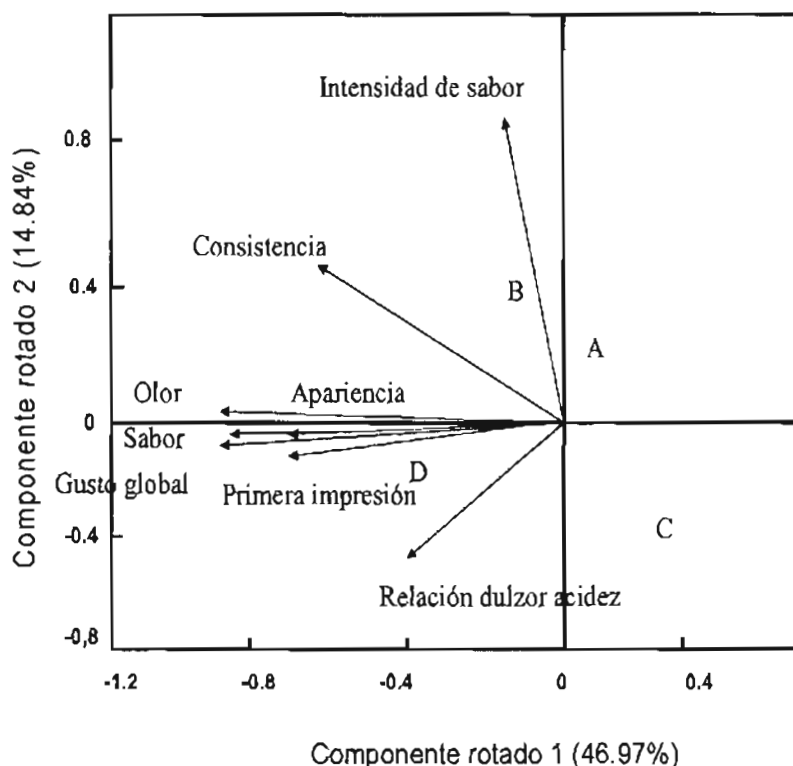


Figura 12. Ubicación de las muestras de tepache con relación a la importancia de distintos atributos evaluados por consumidores.

Los consumidores consideraron que la muestra D tenía un sabor agradable, ligero, con sabor refrescante y con un adecuado grado de fermentación. Las muestras A y B se describieron con un dulzor adecuado, con olor fuerte y que tenían un alto grado de fermentación. La muestra A se consideró agradable, pero no la B. De la muestra C se comentó que tenía un sabor débil, que estaba muy diluida y con sabor azucarado, muy diferente al típico sabor a tepache. Todos los comentarios sobre las muestras coinciden con las evaluaciones hechas por los consumidores. Además coincide con algunas de las características bioquímicas ya que es la menos ácida y dulce.

El análisis de componentes principales (ACP) obtenido para los diferentes atributos después de la rotación varimax, mostraron que el primer componente estuvo cargado negativamente y se presentó una alta intercorrelación en los atributos de olor, sabor, apariencia, primera impresión y aceptación global. El segundo componente estuvo asociado positivamente con la intensidad de sabor. La muestra D fue la bebida que mostró la más alta correlación con estos atributos (Figura 12). Las bebidas A y B fueron las muestras más fermentadas debido al proceso de fermentación que se siguió y estuvieron altamente correlacionadas con la intensidad de sabor (Figura 12). La bebida C no estuvo asociada a las demás bebidas y no se relacionó con ninguno de los atributos. La interacción de los dos primeros componentes en la evaluación global de las bebidas explica alrededor del 61% del total de la varianza de las muestras (Figura 12).

VII.3.1.3 Prueba secuencial comparada de muestras con consumidores

La comparación pareada entre muestras (Tabla 9) mostró que, cuando existían diferencias significativas en la primera impresión como sucedió en las comparaciones AC, AD, BC y CD, lo había entre la mayoría de sus atributos, su aceptación global y su preferencia.

La intensidad de sabor fue significativamente diferente en las 6 comparaciones pareadas, seguido por el sabor en 5, el olor en 4, la consistencia en 3 y la apariencia y la relación dulzor/acidez en 2.

Tabla 9. Prueba comparativa secuencial de tepaches comerciales con consumidores para diferentes atributos sensoriales

Atributos (escala hedónica)	Comparación de muestras pareadas de tepache											
	A vs. B		A vs. C		A vs. D		B vs. C		B vs. D		C vs. D	
Primera impresión(1-9)	6.38	6.21	*6.60	5.60	5.87	*7.02	*6.64	6.04	6.81	6.79	6.19	*7.13
Apariencia (1-5)	3.60	3.44	*3.77	3.41	3.38	*3.91	3.72	3.50	3.71	3.93	3.73	3.99
Consistencia (1-5)	2.71	2.75	*3.22	2.58	2.97	3.05	*3.40	2.51	3.04	2.89	2.59	*3.17
Olor (1-5)	3.20	3.10	*3.38	2.90	3.01	*3.66	*3.57	2.98	3.61	3.54	3.24	*3.74
Sabor (1-5)	3.30	*3.77	*3.62	3.01	3.21	*3.81	*3.75	2.95	3.59	3.66	3.23	*3.90
Relación dulzor/acidez (1-5)	2.95	*3.25	3.19	3.10	2.84	*3.41	3.11	3.20	3.16	3.37	3.19	3.26
Intensidad de sabor (1-5)	2.97	*3.45	*3.21	2.88	3.69	*3.03	*3.52	2.48	*3.61	2.63	2.91	*3.17
Aceptación global (0-10)	7.34	*8.11	*7.73	6.70	7.11	*8.40	*7.71	6.77	7.60	7.80	7.14	*8.16
Preferencia %	45	55	*70	30	30	*70	*70	30	50	50	29	*71

* Diferencias significativas entre muestras $p < 0.05$

En el análisis de preferencia y en la mayoría de las comparaciones por atributos (Tabla 9) se observó que para A-B y B-D no se presentaron diferencias significativas, mientras que en las demás comparaciones A fue preferida sobre C, D sobre A, B sobre C y D sobre C. Lo anterior establece que D fue la bebida con mayor preferencia en las distintas comparaciones.

Las diferencias observadas en los atributos dentro de las comparaciones por pares pueden estar relacionadas probablemente con las variaciones en el proceso y con el grado de fermentación de cada bebida, debido al tipo de fermentación (láctica-alcohólica) que presenta cada bebida (Rubio y col., 1993).

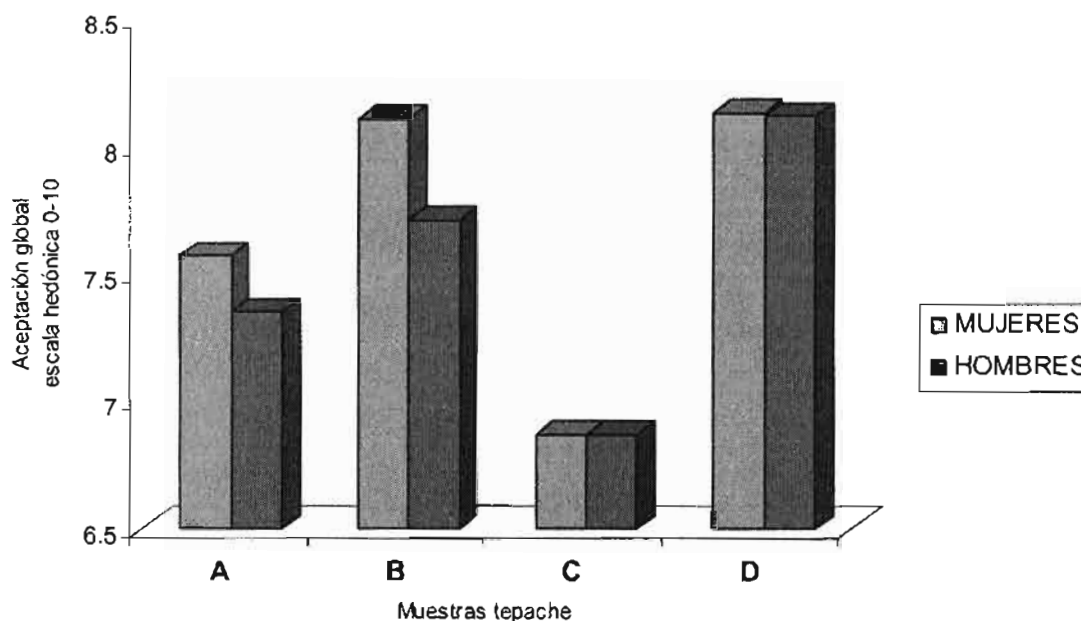


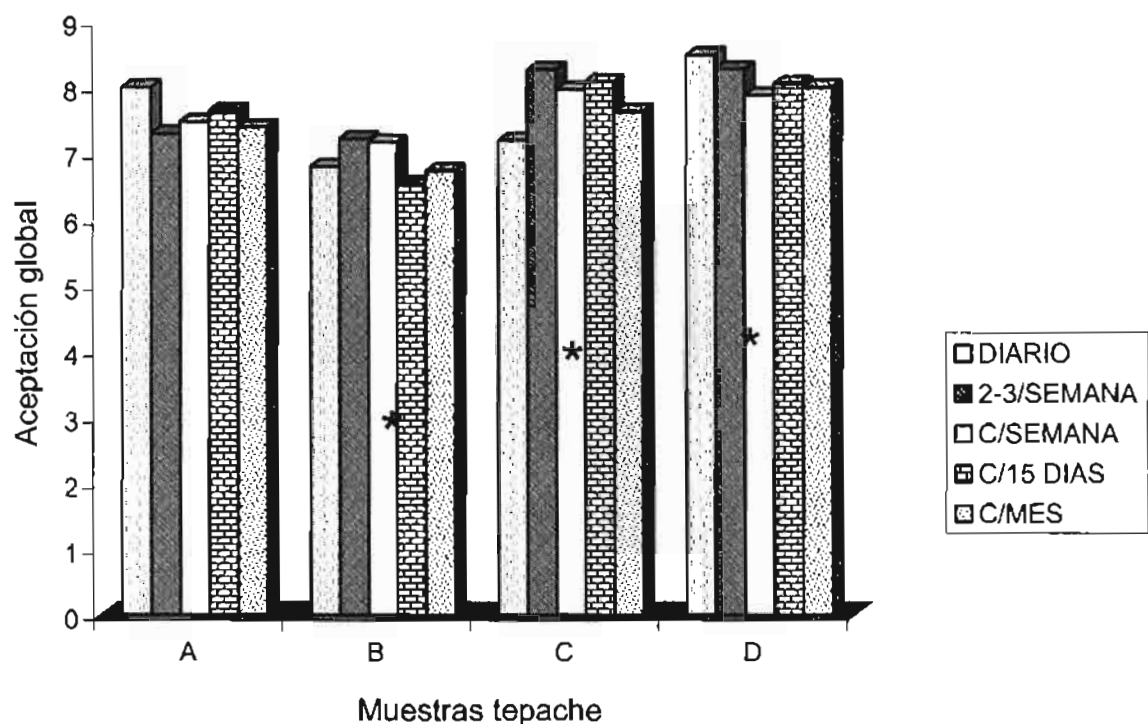
Figura 13. Relación de género con la aceptación global de consumidores.

VII.3.1.4 Relación de género y frecuencia de consumo con la aceptación global monádica en pruebas con consumidores

Los promedios de aceptación global no mostraron diferencias significativas entre hombres y mujeres, lo que indica que ambos tienen afición por la bebida y una percepción similar (Figura 13).

La ecuación de la regresión cuadrática mostró que existe una correlación significativa entre consumidores que beben tepache una vez por semana y la

aceptación global, para las muestras B ($r^2=0.68$), C ($r^2= 0.79$) y D ($r^2= 0.82$) (Figura 14). El modelo explica entre el 68 y el 82 % de la varianza de los datos experimentales. No se encontró una correlación significativa entre la aceptación global y un patrón de consumo más frecuente.



* CORRELACIÓN ALTAMENTE SIGNIFICATIVA $p < 0.05$

Figura 14. Relación de frecuencia de consumo con la aceptación global de consumidores.

VII.3.2 Generación de descriptores

Inicialmente con los jueces entrenados se establecieron 18 descriptores para apariencia, 52 de olor, 3 de gusto, 49 de sabor y aroma y 46 de sabor residual. Durante toda las sesiones se les presentaban estos términos y se establecía la

frecuencia con la que aparecían y se trataba de agrupar por consenso aquellos que pudieran significar lo mismo, como resultado de estas actividades se logró agrupar y reducir la lista a 15 para apariencia, 18 para olor, 3 para gusto, 19 para sabor y aroma y 15 para sabor residual. Nuevamente por consenso se encontró que había términos que se podían incluir en otros por lo que se hizo un segundo agrupamiento, reduciendo aún más la lista. También durante el entrenamiento se detectó que los jueces evaluaban de forma similar algunos descriptores y se efectuó un tercer agrupamiento para facilitar la prueba, finalmente con los análisis de frecuencia y de componentes principales se eliminaron algunos más.

Tabla 10. Factores de carga de componentes principales de descriptores de apariencia de tepache

Descriptores	CP1	CP2	CP3
burbujeante	0.37	0.27	-0.09
brillantez	0.39	0.03	-0.07
color cobre claro	0.32	0.19	-0.13
color cobre oscuro	0.38	-0.14	0.18
opacidad	0.20	0.25	-0.37
turbidez	0.14	0.35	0.18
partículas suspendidas	-0.04	0.54	0.04
translúcido	0.29	-0.17	-0.35
viscosidad	0.34	-0.17	-0.29
frescura	0.26	-0.03	0.53
sin partículas	0.23	-0.25	0.02
color cobre	-0.04	0.52	-0.03
partículas fondo	-0.25	-0.02	0.52
proporción de la varianza total	42.14%	20.91%	11.88%

valores con valor absoluto mayor a 0.31 se ponen en negritas

De los datos agrupados por frecuencia de aparición en el total de las sesiones y con el análisis de componentes principales se estableció cuáles eran los que tenían mayor porcentaje sobre la variabilidad de la bebida, teniendo que, con los tres primeros componentes se explicaba casi el 75 % de la variabilidad debida a la apariencia. Los descriptores que tuvieron mayor influencia en el primer

componente fueron: brillantez, color cobre oscuro, burbujeante, viscosidad y color cobre claro, en el segundo componente las partículas suspendidas, el color cobre y la turbidez. Para el CP3 fueron la frescura, las partículas en el fondo y con un efecto negativo translúcido y opacidad (Tabla 10).

Con el análisis anterior, la frecuencia con que mencionó a cada descriptor y con el consenso de los jueces, en apariencia se decidió que se englobaran todas las tonalidades del color cobre, ya que aparecieron en el CP1, y que la variación del color iba de claro a oscuro, siendo que la evaluación de este descriptor define las variaciones en la tonalidad del color.

Se estableció también por consenso la relación entre turbio y translúcido para determinar cuando la bebida tenía mayor o menor cantidad o bien ausencia de sólidos, término que no tuvo influencia en los tres primeros componentes en el ACP. Este descriptor muy probablemente esté relacionado con el contenido de fruta y con el grado de fermentación del tepache por lo que se eliminó el descriptor sin partículas. Asimismo se eliminó el término partículas en el fondo ya que las partículas permanecían en el líquido durante poco tiempo y después tendían a asentarse.

Se estableció que había una relación entre los descriptores de brillantez y opacidad ya que en conjunto indicaron en cierta medida el grado de frescura del producto, observándose que, cuando el producto era más brillante era también más fresco, a medida que se iba perdiendo la brillantez, era porque el producto estaba más fermentado o menos fresco y en consecuencia se hacía más opaco. Además corroborando lo anterior, en el ACP el término fresco apareció con una influencia positiva fuerte en el CP3, mientras que el descriptor de opacidad apareció también pero con un efecto negativo.

Para los descriptores de olor se tomaron los 3 primeros componentes donde se explicaba hasta el 72% de la variabilidad seleccionándose 8 descriptores:

fermentado, sensación de olor picante, piña fermentada, naranja, tamarindo, dulce, vinagre y afrutado (Tabla 11). Los cuatro primeros tuvieron fuerte influencia en el CP1 y los demás en el CP2. Se decidió eliminar el descriptor de olor a manzana por no aparecer con frecuencia y no tener influencia en los tres primeros componentes dentro del ACP.

Tabla 11. Factores de carga de componentes principales para descriptores de olor de tepache

Descriptores	CP1	CP2	CP3
fermentado	0.39	0.11	-0.13
afrutado	0.16	0.40	0.28
dulce	0.31	0.31	0.01
piña fermentada	0.33	0.28	-0.27
piña	-0.14	0.30	0.12
fermentación avanzada	-0.16	-0.30	0.44
alcohol	0.18	-0.32	-0.48
hule	0.31	-0.14	0.40
tamarindo	0.33	-0.25	0.22
vinagre	0.13	-0.42	-0.10
naranja	0.33	0.02	0.37
manzana	0.27	0.15	-0.15
picante	0.37	-0.30	0.00
proporción de la varianza total	38.72%	17.76%	15.66%

valores con valor absoluto mayor a 0.31 se ponen en negritas

Aparte del análisis se decidió por consenso, eliminar los descriptores de olor de alcohol por ser difícil su detección y sólo ser detectado por la mayoría de los jueces cuando había una fermentación demasiado avanzada en el tepache. En el caso del olor a hule este descriptor sólo fue detectado en una bebida y no se pudo relacionar con alguna característica en particular, tal vez ese olor pudo deberse a que en este lugar de venta se adquiría el producto en vasos de poliestireno, esto a pesar de tener un peso importante en el CP1.

Para la evaluación del gusto se desarrollaron los descriptores ácido, dulce y amargo pero por consenso se estableció que fueran considerados únicamente dentro de sabor y aroma donde aparecen también.

Para los descriptores de sabor-aroma (Tabla 12) hubo dificultad para distinguir de forma individual todos aquellos relacionados con un aroma frutal, se encontró que el ingrediente con más sabor y aroma entre las frutas era la piña, descriptor que apareció con fuerte influencia en el CP1. Normalmente es la fruta que más se utiliza para elaborar esta bebida, ya que se ha visto que el uso de la cáscara en algunos productos fermentados como los vinos blancos, puede incrementar la percepción del aroma, así como hacer más afrutado el aroma del producto (García-Romero y col., 1999).

Tabla 12. Factores de carga de componentes principales para descriptores de sabor-aroma de tepache

Descriptores	CP1	CP2	CP3
dulce	0.33	-0.16	-0.06
afrutado	0.07	-0.28	0.29
fermentado	0.33	0.71	-0.16
piña	0.31	0.08	0.33
ácido	0.36	-0.31	-0.21
amargo	0.36	0.32	0.00
picante	0.38	-0.18	0.20
burbujeante	0.16	0.37	-0.18
piña fermentada	0.28	0.15	-0.52
tamarindo	0.08	-0.32	-0.29
alcohol	0.23	0.47	0.17
astringente	0.31	-0.35	0.24
manzana	-0.07	-0.18	-0.47
proporción de la varianza total	31.90%	19.08%	15.00%

valores con valor absoluto mayor a 0.31 se ponen en negritas

A pesar de que otras frutas como la naranja, el tamarindo y la manzana son usados también como ingredientes y de igual forma son ricos en aroma y sabor, se decidió englobar su sabor y aroma en el descriptor afrutado, ya que no pudieron ser distinguidos por los jueces tal vez por la cantidad tan baja que se utiliza para elaborar el tepache.

En el caso de la manzana se percibieron notas relacionadas con este fruto, pero no es un ingrediente que se use con regularidad para elaborar la bebida y no es fácil distinguir ésta de otras notas frutales por lo que, se decidió eliminar por consenso. Los jueces comentaron que el aroma frutal estaba relacionado principalmente con el aroma a piña y que en muy pocos casos se podía distinguir aromas de otras frutas.

En el análisis de componentes principales se observó que el aroma a piña estaba más relacionado con los descriptores de piña fermentada y fermentado que con los demás aromas frutales. Por todo lo anterior se decidió dejar únicamente el descriptor de aroma a piña y quitar el de afrutado y el de las otras frutas.

Además con los tres primeros componentes que se utilizaron en el análisis se logró explicar hasta el 65% de la variabilidad en las bebidas, de ahí se seleccionaron 9 descriptores quedando: dulce, ácido, fermentado, piña, sabor picante, amargo y astringente con la mayor carga dentro del primer componente y la sensación de alcohol y la burbujeante en el segundo.

Con respecto a los descriptores de sabor residual, en aquellos relacionados con frutas sucedió lo mismo que para sabor y aroma, tomando la misma decisión de dejar únicamente el descriptor de piña (Tabla 13). En el caso de los descriptores picante y alcohol se estableció que eran características que perduraban muy poco y que eran difíciles de detectar como resabio, por lo que se decidió eliminarlos. El sabor residual a hule se eliminó por las mismas razones expuestas en los atributos de olor. Todas estas decisiones fueron avaladas también por el análisis de

componentes principales donde los 3 primeros componentes explicaron el 64% de la variabilidad en los tepaches y los descriptores seleccionados tuvieron la mayor carga en los dos primeros componentes (Tabla 13).

Tabla 13. Factores de carga de componentes principales para descriptores de sabor residual de tepache

Descriptores	CP1	CP2	CP3
dulce	0.20	-0.39	-0.08
fermentado	0.12	-0.41	0.06
amargo	0.39	-0.07	0.38
picante	0.20	-0.07	0.17
ácido	0.38	-0.07	-0.42
piña	0.25	0.48	0.15
alcohol	0.32	-0.14	0.31
afrutado	-0.10	-0.13	0.41
burbujeante	-0.12	0.18	0.56
astringente	-0.09	0.45	-0.09
manzana	0.32	0.38	-0.07
madera	0.48	0.11	-0.10
hule	0.28	0.00	0.07
proporción de la varianza total	26.66%	21.78%	15.79%

valores con valor absoluto mayor a 0.31 se ponen en negritas

Como se ha mencionado en los diferentes atributos del tepache, la mayoría de los descriptores se encuentran relacionados con el proceso de fermentación de la bebida como serían el olor, sabor-aroma y sabor residual a fermentado, a ácido, a alcohol y a picante (fermentaciones alcohólica y láctica), la apariencia y sabor-aroma burbujeantes (producción de CO₂) y los descriptores de apariencia brillante y translúcido; otros se relacionan con las frutas que se utilizan como sustrato para la fermentación y los demás, pueden ser resultado de la interacción sustrato-fermentación, o sea los cambios que se dan durante la fermentación en combinación con la transformación de la fruta. El de madera y astringente tal vez

estén relacionados con el tipo de recipientes donde se produce el tepache y con las sustancias que puedan aportar a la bebida estos barriles.

Para poder desarrollar un vocabulario adecuado en los descriptores generados y asegurar términos precisos se utilizaron diferentes estándares de estímulo físico, lo que permitió establecer a los jueces la identificación y la definición exacta de cada descriptor

Después de las consideraciones anteriores en la Tabla 14 se observan los descriptores finales generados, en la Tabla 15 cuál es el significado para cada aspecto de la bebida y en la Tabla 16 las referencias físicas utilizadas en distintos descriptores

Tabla 14. Descriptores finales de tepache

APARIENCIA	OLOR	SABOR-AROMA	SABOR RESIDUAL
Burbujeante	Dulce	Dulce	Dulce
Brillante	Afrutado	Ácido	Ácido
Color cobre	Fermentado	Fermentado	Fermentado
Translúcido	Piña fermentada	Piña	Piña
Partículas suspendidas	Naranja	Picante	Alcohol
Viscoso	Tamarindo	Alcohol	Amargo
	Vinagre	Burbujeante	Astringente
	Picante	Amargo	Manzana
		Astringente	Madera

VII.3.3 Entrenamiento de los jueces

Para estudiar la capacidad discriminatoria y la reproducibilidad de cada juez, se realizó un análisis de varianza de dos factores (muestras y sesiones) con los resultados obtenidos en las sesiones de adiestramiento con cada juez y con cada descriptor. Se tomó como base que todos los jueces tenían la capacidad para

Tabla 15. Vocabulario para descriptores de tepache utilizado en el análisis cuantitativo descriptivo de comerciales

Descriptores	Significado de cada descriptor
<u>Apariencia</u>	
Burbujeante	Presencia de burbujitas pequeñas en la bebida, ya sea en la pared del recipiente o en toda la bebida
Brillante	Superficie con diferentes grados de brillo
Color cobre	Tonalidades de cobre desde claro hasta oscuro
Translúcido	Qué tanto se puede observar a través de la bebida dependiendo de la cantidad de sólidos presentes
Partículas suspendidas	Cantidad de partículas presentes en toda la bebida
Viscoso	Curva que forma la bebida cuando se inclina dentro del vaso (a mayor viscosidad mayor será esa curva)
<u>Olor</u>	Cantidad de olor dulce que desprende la bebida (ya sea de azúcar normal o quemada)
Dulce	Olor a fruta que desprende la bebida (piña-naranja-tamarindo-manzana)
Afrutado	Olor a producto fermentado según sea el avance de fermentación en la bebida
Fermentado	Olor a piña con cierto grado de fermentación característico de esa fruta
Piña fermentada	Olor característico a esa fruta fresca
Naranja	Olor característico a esa fruta fresca
Tamarindo	Olor a vinagre de manzana
Vinagre	Olor fuerte ácido o alcohólico según descripción particular de cada juez (cada juez debe corroborar con que l
Picante	
<u>Sensación (sabor-aroma)</u>	
Dulce	Sensación provocada por contenido de azúcar
Ácido	Sensación provocada por la cantidad de ácido en una muestra
Fermentado	Sabor-aroma dada por el grado de fermentación del tepache
Piña	Sabor característico de fruta fresca o jugo procesado
Picante	Sabor-aroma fuerte ácido o alcohólico según descripción particular de cada juez
Alcohol	Contenido de alcohol en la bebida
Burbujeante	Sensación referente a la presencia de burbujitas pequeñas en la bebida, según el grado de fermentación
Amargo	Sensación básica referente a la presencia de sustancias amargas producto de la degradación de restos de n
Astringente	Sensación de sequedad, enjutzamiento o de ligero dolor provocada en la cavidad bucal (no confundir con ama
<u>Sabor residual</u>	
Dulce	Sensación remanente dulce, una vez que terminó de consumir la bebida
Ácido	Sensación remanente ácida, una vez que terminó de consumir la bebida
Fermentado	Sensación remanente según el grado de fermentación del tepache, después de consumir la bebida
Piña	Sensación remanente de fruta fresca o jugo al terminar de consumir la bebida
Alcohol	Sensación remanente del grado de alcohol que queda según su contenido en la bebida
Amargo	Sensación remanente de sustancias amargas producto de la degradación de restos de naranja en la bebida,
Astringente	consumir Sensación remanente de sequedad, enjutzamiento o de ligero dolor provocada en la cavidad bucal, una vez q

Tabla 16. Referencias utilizadas para los descriptores de tepache

Descriptor	Referencias
Burbujeante	Alka seltzer
Viscosidad	Pectina + jugo de manzana
Olor dulce	
Sabor dulce	Sabor caramelo
Afrutado	Sabor naranja + jugo de (manzana, piña, tamarindo)
Color	Caramelo
Alcohol	Alcohol
Vinagre	Vinagre
Picante	Alcohol + vinagre
Madera	Serrín de madera
Fermentado	Tepache con 48 h extras de fermentación
Piña fermentada	Piña fermentada durante 48 h
Afrutado piña	Jugo de piña
Afrutado tamarindo	Jugo de tamarindo
Amargo	Raspadura de naranja en agua
Astringente	Té negro

discriminar ya que tuvieron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.30$) para al menos 25 de los 32 atributos (Pastor y col. 1996; Zook y Wessman, 1997).

De los 32 descriptores evaluados, hubo algunos en donde por los intervalos de variación que se detectaron en las bebidas de referencia los jueces no lograron desarrollar una capacidad discriminativa. Seis jueces no tuvieron capacidad discriminativa en los descriptores de olor a tamarindo (jueces 1, 2, 3, 4, 6, y 7) y sabor a piña (jueces 1, 2, 4, 6, 7 y 8), 5 (jueces 1, 3, 4, 5 y 7) en los de sabor ácido y 7 (ninguno excepto 6) en sabor residual ácido, 7 (ninguno excepto 5) en piña residual, 5 (jueces 1, 2, 4, 6 y 8) en sabor astringente, y 4 (1, 3, 6, 7 y 8) en astringente residual. En estos descriptores, cuando se realizó el análisis cuantitativo descriptivo se mantuvieron las referencias y se les hizo hincapié en que trataran de tener más cuidado al discriminar aquellos descriptores que hubiesen dado problemas.

Aparte hubo algunos jueces que no tuvieron capacidad discriminativa en otros descriptores como olor a naranja 4 (1, 3, 6 y 7), olor a dulce 2 (jueces 4 y 8) partículas suspendidas 2 (jueces 2 y 5) y sabor amargo 2 (jueces 2 y 8).

Damasio y Costell (1991) mencionan que cuando un juez tiene capacidad discriminativa para evaluar descriptores pero falla en su habilidad para evaluar algunos, no existe un valor para aceptar o rechazar a ese juez; se puede tener confianza en sus evaluaciones si es asertivo con diferencias significativas con una $p \leq 0.30$, es decir, para este estudio en 25 de los 32 descriptores generados. En este caso todos los jueces estuvieron por arriba de este valor. Así, los jueces 1, 4, 6 y 7 fallaron en 7 descriptores, el 3 y el 8 en 6, el 2 en 5 y el juez 5 en 3, en varios de estos descriptores no se pudo discriminar tal vez por el intervalo de variación tan bajo que presentaron las bebidas, o bien, porque es difícil para los jueces distinguir entre aromas que fácilmente desarrollan un efecto sinérgico, tal es el caso de los aromas de frutas o afrutados en donde los jueces sólo alcanzaron a desarrollar la capacidad para distinguir aromas de frutas en general sin poder discriminar el tipo de fruta.

Otro punto es la acidez, donde tampoco tuvieron la capacidad para discriminar este descriptor, tanto en sabor-aroma como en sabor residual, aquí, al ser una bebida muy ácida, es factible que al probarla en una bebida dulce se pueda confundir, debido al efecto que tiene el dulce sobre la percepción del ácido, esto ya se había detectado de igual manera en el estudio con consumidores (Stampanoni, 1993).

Por lo anterior, se puso especial atención a la hora de realizar el análisis cuantitativo descriptivo poniendo referencias y la carta de los descriptores a la hora de evaluar, con el objeto de atenuar o eliminar ese problema.

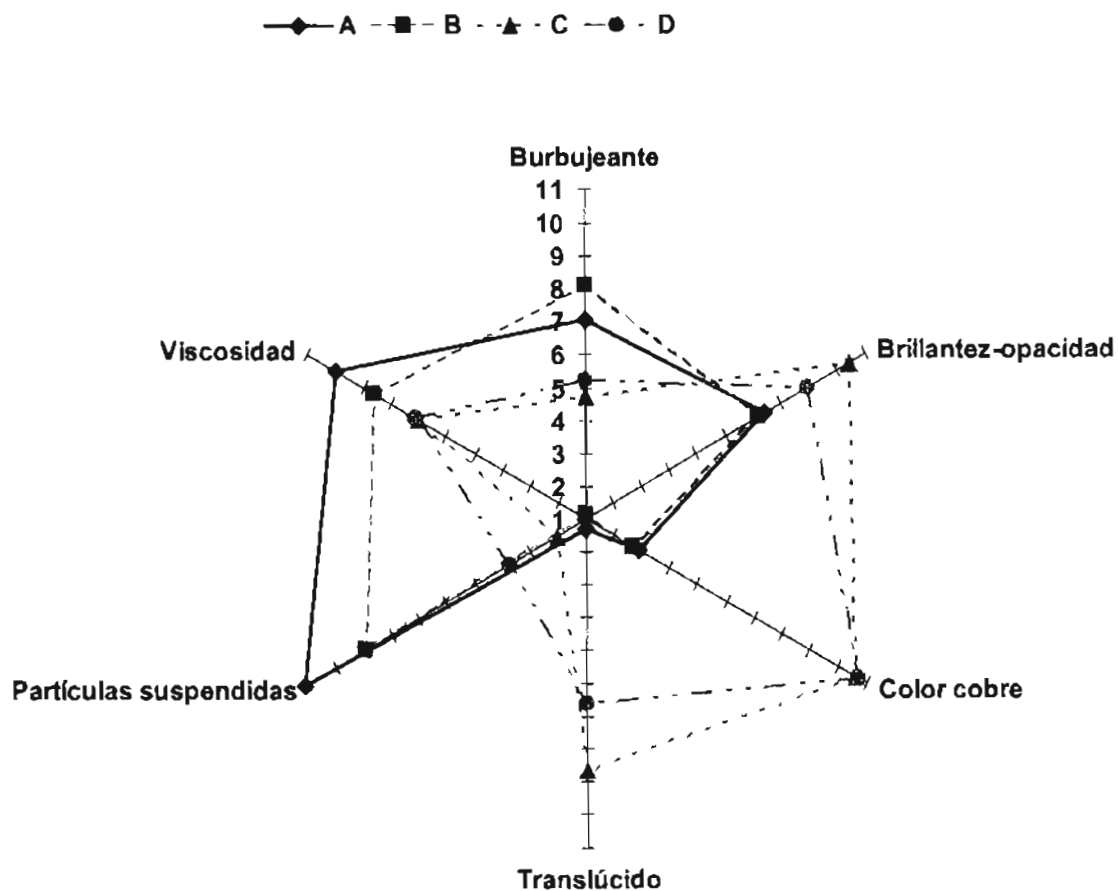
VII. 3.4 Análisis cuantitativo descriptivo

El análisis cuantitativo descriptivo de las cuatro bebidas analizadas mostró para apariencia una clara división entre las bebidas que son elaboradas con tres pasos de fermentación (A y B) y dos pasos (C y D) siendo significativamente diferentes, ($\alpha = 0.05$) (Figura 15).

Las primeras fueron más burbujeantes, brillantes, claras, translúcidas, viscosas y con más partículas suspendidas, en general estos descriptores dan idea de bebidas con un mayor grado de fermentación como se había establecido desde el desarrollo de los descriptores, excepto el parámetro de translúcidas que se esperaba que a mayor grado de fermentación se hicieran más opacas por el desarrollo de microorganismos.

En relación con los descriptores de olor, se puede observar que no existieron diferencias significativas entre las cuatro bebidas excepto para los descriptores fermentado y piña fermentada, donde se volvió a presentar la división de las

APARIENCIA



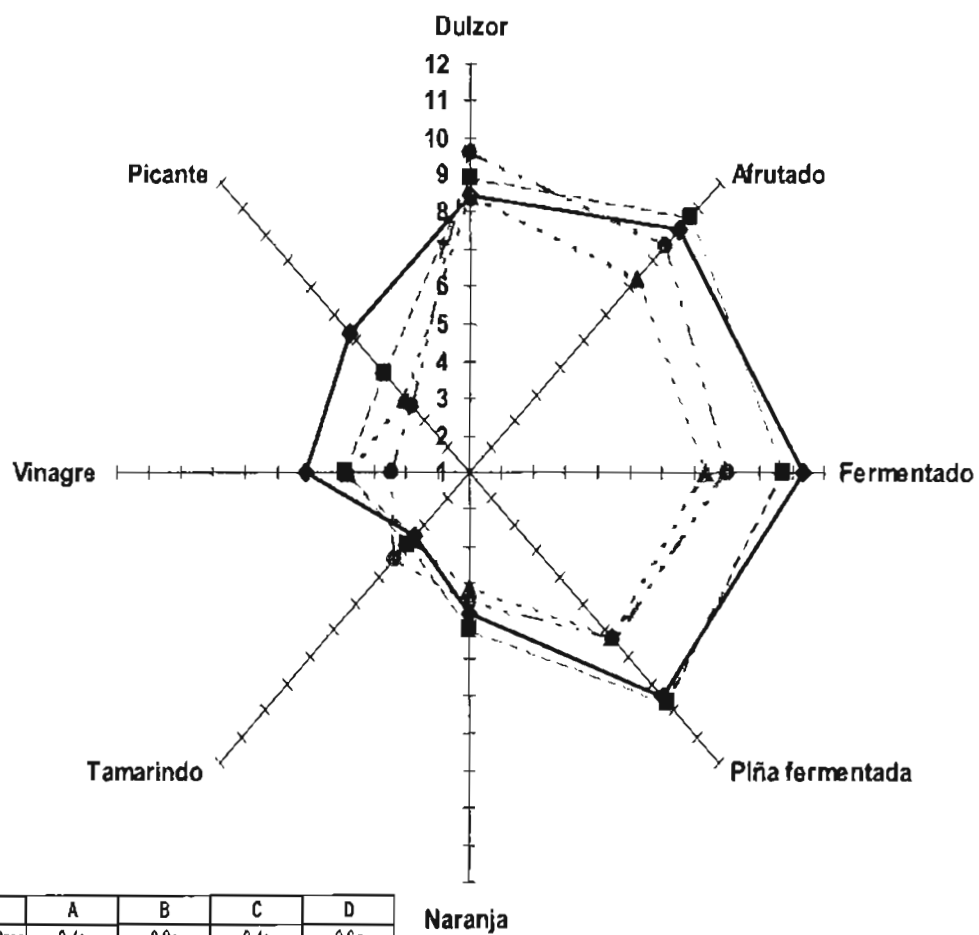
	A	B	C	D
Burbujeante	7.06a	8.06a	4.7b	5.2b
Brillantez-opacidad	7.4a	7.2a	10.4	8.9
Color cobre	2.9a	2.7a	10.6b	10.7b
Translúcido	1.3a	0.87a	8.6	6.6
Partículas suspendidas	11.11a	8.9a	2.02b	3.71b
Viscosidad	9.96a	8.6ab	7b	7.1b

* letras diferentes entre cuadros significan diferencias significativas entre bebidas $\alpha = 0.05$

Figura 15. Perfil descriptivo de apariencia en muestras de tepache.

OLOR

—◆— A —■— B —▲— C —●— D



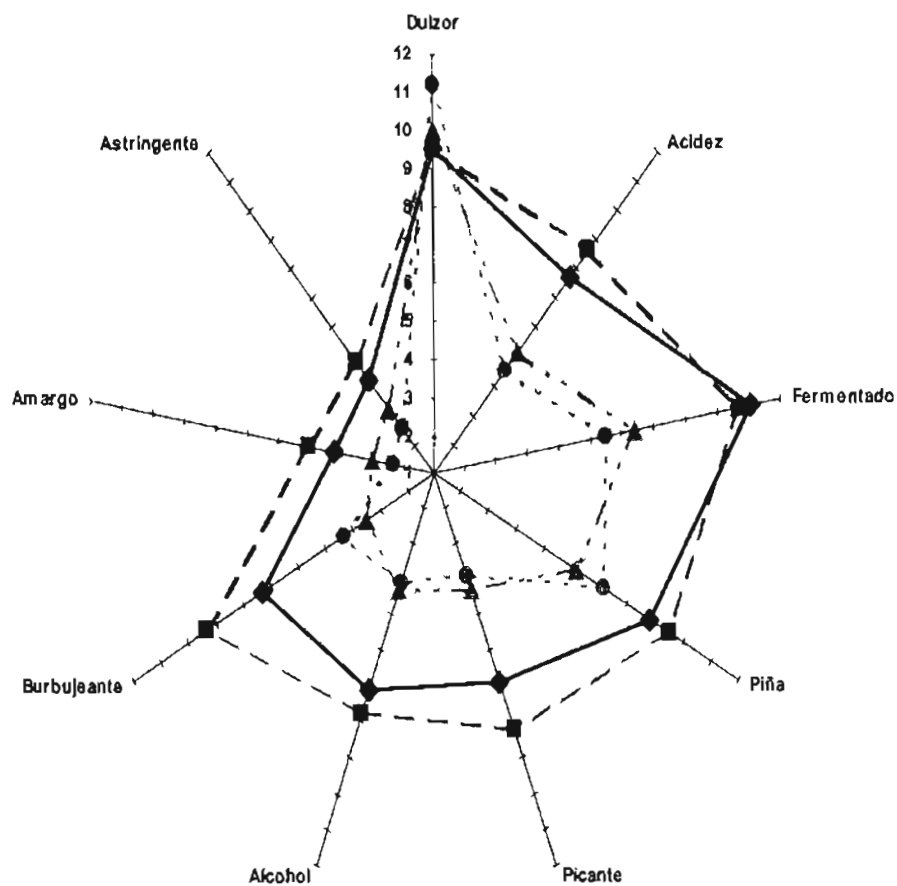
	A	B	C	D
Dulzor	8.4a	8.9a	8.4a	9.6a
Añutado	10.2a	10.7a	8.3	9.6a
Fermentado	11.3a	10.7a	8.3b	9b
Piña fermentada	9.5a	9.7a	7.2b	7.3b
Naranja	4.8a	5.2a	4.1a	4.5a
Tamarindo	3.4a	3.7a	3.5a	4.3a
Vinagre	6.1a	4.9ab	4.8ab	3.4b
Picante	6.3b	4.8a	3.8a	3.5a

* letras diferentes entre cuadros significan diferencias significativas entre bebidas $\alpha = 0.05$

Figura 16. Perfil descriptivo de olor en muestras de tepache.

SABOR-AROMA

—◆— A —■— B —▲— C —●— D

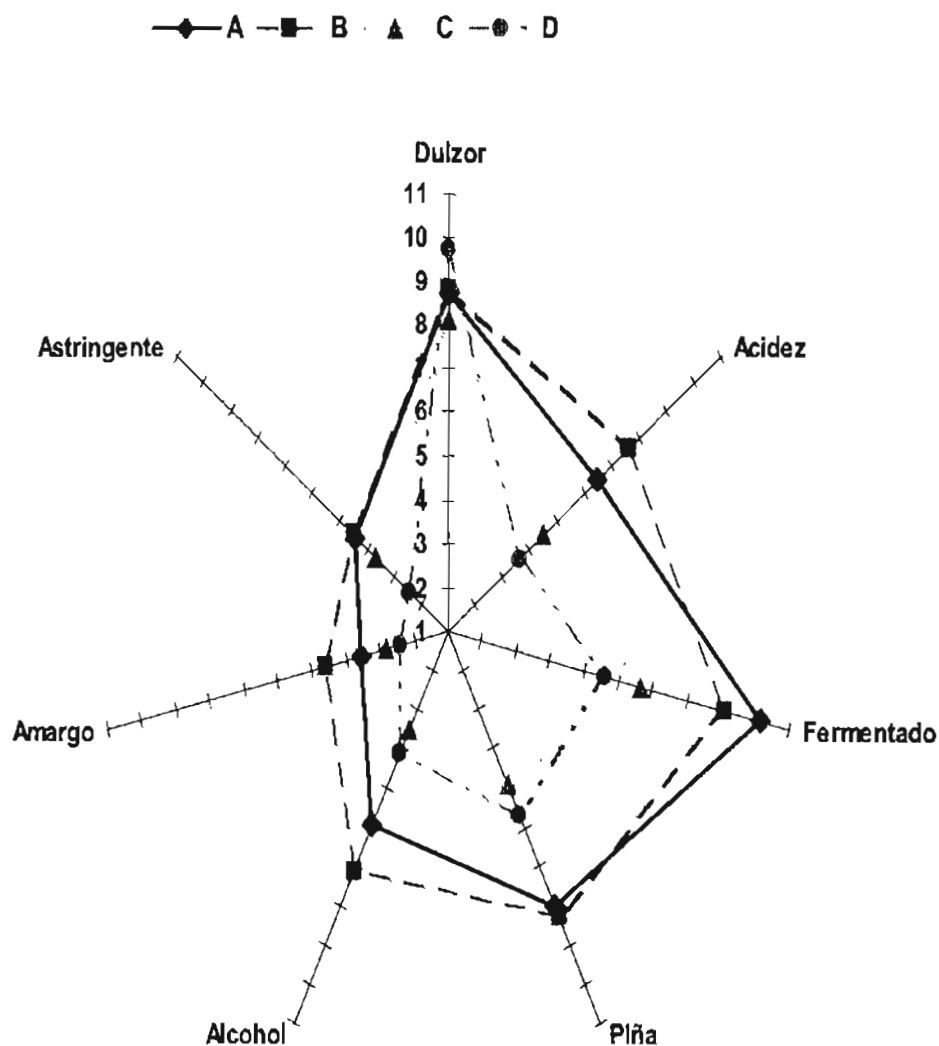


	A	B	C	D
Dulzor	9.5a	9.5a	10ab	11.2b
Acidez	7.7a	8.6a	5.1b	4.5b
Fermentado	11.11a	10.7a	7.4b	6.5b
Piña	8.8a	9.5a	6.1b	7.1b
Picante	6.9a	8.2a	4.3b	3.9b
Alcohol	7.1a	7.8a	4.3b	4.1b
Burbujeante	7.3	9.3	3.5b	4.3b
Amargo	4.2a	5a	3b	2.3b
Astringente	4.2ac	4.8a	3.2bc	2.6b

* letras diferentes entre cuadros significan diferencias significativas entre bebidas $\alpha = 0.05$

Figura 17. Perfil descriptivo de sabor-aroma en muestras de tepache.

SABOR RESIDUAL



	A	B	C	D
Dulzor	8.7a	8.8ab	8.1a	9.7b
Acidez	6.5a	7.6a	4.5b	3.6b
Fermentado	10.1a	9.1a	6.6b	5.6b
Piña	8a	8.25a	4.9b	5.7b
Alcohol	5.9	7.1	3.5b	4.1b
Amargo	3.5a	4.6	2.8ab	2.4b
Astringente	4.4a	4.5a	3.7a	2.4

* letras diferentes entre cuadros significan diferencias significativas entre bebidas $\alpha = 0.05$

Figura 18. Perfil descriptivo de sabor residual en muestras de tepache.

bebidas A y B por un lado, y C y D por el otro, siendo las de tres pasos de fermentación las que generaron olores más fuertes. En olor a vinagre y picante solo A fue diferente a las demás (Figura 16).

Los descriptores de sabor-aroma y de sabor residual (Figuras 17 y 18) presentaron un comportamiento semejante a los de apariencia donde se detectaron diferencias significativas entre las bebidas con tres pasos de fermentación y dos, siendo casi siempre más altos los valores para describir el sabor-aroma y el sabor residual. En las primeras solo los descriptores de astringencia no tuvieron diferencias significativas en sabor residual y en sabor-aroma sólo hubo diferencia entre A y D, y entre B y C, esto tal vez varió por el tipo de barriles donde se llevó a cabo la fermentación, ya que pueden ser más o menos viejo y esto hace que se presente mayor o menor intercambio de compuestos que dan la sensación de astringencia y resabio consecuente.

En relación con el sabor-aroma a dulce la bebida con más alta calificación fue D pareciéndose a C pero no a A ni a B, en el dulzor residual también fue D la que dejó mayor resabio dulce pero en este caso se pareció a B pero no a A ni a C, esto puede variar ya que los productores pueden adicionar azúcar antes de la venta, teniendo la costumbre de tener un producto más o menos dulce según el gusto de los clientes; en el caso del sabor residual dulce tal vez aquí, el tipo de azúcar (blanca, morena o quemada) pueda variar y esto pudo dejar un resabio diferente (Figura 18).

Casi la mayoría de los descriptores desarrollados en el tepache ayudan a definir diferencias marcadas entre los procesos de elaboración, siendo A y B productos más fuertes con mayor grado de fermentación.

El uso del análisis cuantitativo descriptivo permitió distinguir las variaciones en relación al proceso de elaboración lo que hace a este análisis dentro de la

evaluación sensorial una herramienta útil para tener criterios de calidad y poder distinguir diferencias entre tepaches de diferente forma de producción.

VII. 4 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO

Con la información obtenida con los productores, las observaciones hechas en los lugares de venta y la caracterización de la bebida realizada en este estudio, se puede decir que el tepache es una bebida que puede elaborarse con diferentes frutas, pero al menos, en los lugares donde se realizó esta investigación, se puede decir que la fruta que más frecuentemente se utiliza como materia prima es la piña, de ésta se agrega únicamente la cáscara con restos de pulpa que quedan durante el pelado manual, en algunos casos se encontró que puede usarse el centro de la fruta pero esto no es muy común.

Otro de los ingredientes importantes es la naranja, aquí lo más utilizado son los restos de la naranja una vez que se ha extraído el jugo, algunos productores utilizan la naranja partida a la mitad y exprimen un poco de jugo sobre el agua donde se va a llevar a cabo la fermentación poniendo el resto como sustrato para fermentar. Es muy variable la cantidad de naranja que se adiciona y más lo es aún la cantidad de jugo que se pone, sin embargo, casi en todos los lugares donde se obtuvo información declararon que si usaban naranja.

El tercer ingrediente que más se utiliza en las mezclas comerciales es el tamarindo, este fruto se usa de manera diferente a los dos anteriores ya que aquí únicamente se lava y se machaca sin eliminar la cáscara, pero si para permitir que el agua entre en contacto con la pulpa y pueda disolverse un poco en el agua. Éste es de los ingredientes que algunos adicionan desde el principio y otros lo ponen en el transcurso de la fermentación, algunas veces sustituyendo a la piña o a la naranja. También los productores indicaron que casi siempre utilizan este fruto.

Todos estos ingredientes pueden usarse mezclados o en forma individual con agua en diferentes barriles y en un momento determinado cuando el productor considera que ya debe preparar el producto final, los mezcla y los deja fermentar un tiempo más.

Cada productor tiene una forma particular de preparar su bebida y normalmente guarda con recelo puntos clave tanto en la proporción de ingredientes como en detalles del proceso, sin embargo, a continuación se describen el proceso y algunas diferencias detectadas por simple observación, por la información de los productores, por los análisis realizados o por los microorganismos involucrados:

Inicialmente se lavan los barriles con agua potable y se restriegan con escobeta o escoba las paredes del barril, después se enjuagan varias veces con agua potable, esta acción sólo se realiza después de que se han realizado varias fermentaciones. Una vez limpios los barriles se pone agua potable de la llave, normalmente el agua que llega de la toma se pasa por un filtro, sólo los productores de las muestras C y D cuentan con este filtro. Los barriles se llenan hasta la mitad y después se adicionan las frutas, primeramente se ponen las cáscaras de la piña después el tamarindo machacado y hasta el final la naranja.

Cabe mencionar que en la muestra A los productores señalaron que ponían las tres frutas al mismo tiempo, pero según observaciones es factible que vayan agregando un poco más de fruta después de terminar cada fermentación y dejan fermentar la misma fruta durante varios procesos y sólo agregan más agua. En las demás muestras (B, C y D) parece que sí adicionan fruta nueva después de cada fermentación.

Las frutas (piña-naranja-tamarindo) normalmente se agregan en proporciones 2:1:1, en total las tres frutas cubren el 10 % del total de la bebida como se describió en la Figura 1. Para las muestras A y B se pone a fermentar el barril sin

azúcar durante 24 horas al cabo de los cuales diluyen con agua al 50%, el líquido se pasa a otro barril, se agrega un 10% de azúcar estándar y se deja fermentar 24 horas más, este procedimiento lo repiten una vez más sólo que el tiempo de fermentación se reduce a 12 h.

Al llegar a un total de 60 horas de fermentación se estandariza la cantidad de azúcar por lo que se agrega para ajustar la bebida entre 12-13 °Brix. En este momento también se adiciona azúcar quemada para darle una tonalidad cobriza que puede variar de claro a oscuro que debe ser semejante en color a cuando se endulza con piloncillo, que es la forma más tradicional de endulzar la bebida, ya que es como se prepara de forma tradicional a nivel casero y también en la mayoría de las regiones del país. A partir de este momento, se adiciona hielo en grandes trozos para frenar un poco la fermentación y que el producto ya no cambie demasiado en sus características sensoriales. Es muy común que por el desplazamiento de venta que normalmente tiene la bebida se tarde hasta 12 horas más en vender un barril de tepache.

Para las bebidas C y D ponen a fermentar las frutas en el barril pero en éstas se adiciona 10% de azúcar y se deja fermentar durante 48 horas, posteriormente se diluye con agua al 50% y se pasa el líquido a otro barril, se agrega también un 10% de azúcar aproximadamente hasta alcanzar también de forma aproximada 12-13 °Brix y se deja fermentar de igual forma que en las muestras anteriores cuando menos 12 horas más. En este momento también se adiciona azúcar quemada y hielo hasta su momento de venta

Con respecto a las bebidas analizadas pudo obtenerse información con respecto a las variaciones que se pueden presentar en la forma de procesar el producto. Como ya se ha mencionado las dos primeras bebidas A y B son elaboradas únicamente con las frutas y agua y se deja fermentar durante 24 horas como mínimo, dependiendo de la temperatura ambiente, algunas veces el productor decide alargar el tiempo de fermentación y sólo cuando observa el avance de la

fermentación y considera que está listo, entonces adiciona agua diluyendo al 50% el producto, algunas veces puede agregar más de fruta o bien solo agua y azúcar, todo esto lo pone en un barril limpio y vuelve a dejar fermentar por otras 24 horas dependiendo de cómo observe el producto.

En el caso de la bebida A es común que cada fruta se fermente por separado en agua durante 24 h y al llegar a este punto es donde hace la mezcla según el criterio del productor. Normalmente, el ingrediente que más utilizan en esta bebida es la piña y normalmente los otros ingredientes se mezclan en menor proporción, se adiciona nuevamente azúcar, algunas veces se agrega azúcar quemada pero en otras ponen colorante artificial con color de caramelo que da tonalidades semejantes al piloncillo y al azúcar quemada.

Para la bebida B el proceso se lleva a cabo de forma similar solo que desde el inicio de la fermentación se utilizan tres frutas y solo hasta la parte final de la fermentación (60 h) se adiciona azúcar quemada para darle el color y el sabor deseado a la bebida.

Para los tepache C y D el proceso es diferente, se elabora el tepache colocando en el barril la fruta, el agua y el azúcar desde el inicio dejando fermentar durante 48 h, al cabo de este tiempo se diluye a la mitad, se pone más azúcar y azúcar quemada, se pasa a otro barril limpio y se deja fermentar entre 12 y 24 horas o más teniendo un producto listo para la venta desde el momento en que se transfiere al segundo barril. Aunque por el desplazamiento que tiene el producto, normalmente se tiene una fermentación lenta durante este último lapso, ya que en las cuatro bebidas y en general la mayoría de los productores artesanales agregan trozos grandes de hielo al tepache, lo que les confiere la temperatura adecuada para hacerla una bebida altamente refrescante y que permite que el producto se fermente más despacio.

Por tanto, en esta parte de la fermentación puede haber productos con un sabor y aroma más fermentado según se vaya vendiendo el producto, algunas veces incluso puede quedar un poco de tepache que se guarda en el barril para el siguiente día donde se vuelven a corroborar sus atributos sensoriales y si está todavía bien, se comercializa y si no, se mezcla con tepache nuevo que se ha preparado para venderse ese día.

Es muy común que los productores realicen mezclas para tener siempre una bebida con inmejorables características sensoriales manejando en el trayecto de fermentación diluciones y mezclas que hace al producto final un tepache con una calidad bastante semejante en la mayoría de las veces. En contadas ocasiones y sobre todo cuando la venta es muy baja los productores se ven obligados a vender el producto con dos y hasta con tres días más de fermentación. En estos productos pueden aparecer atributos no deseables a pesar de las mezclas que los productores hacen, esto generalmente se da en épocas de lluvias cuando el consumidor no compra tanto el producto y sobre todo cuando en las mañanas las temperaturas son altas.

A pesar de ser una bebida donde la cantidad de fruta no es muy alta, muchos de los atributos sensoriales y de aroma provocados por la materia prima y la fermentación se mantienen en el producto final e incluso se incrementan durante el proceso. Además, aunque se diluya el producto varias veces, si se adiciona azúcar y se pone nuevamente a fermentar, se puede tener un tepache con atributos semejantes a cuando se tiene mayor cantidad de fruta, esto, debido a los productos de fermentación que generan los microorganismos, lo que fue corroborado mediante las evaluaciones bioquímicas y sensoriales realizadas con los consumidores y con los jueces entrenados. Así, el productor puede tener 3 ó 4 fermentaciones sin agregar fruta, o poniendo cantidades mínimas y solo con la segunda fermentación y con la misma materia prima de la primera fermentación se puede tener un producto aceptable para el consumidor. Cuando el productor

considera que ya no se debe continuar la misma fermentación, entonces los barriles se vacían y se enjuagan o se lavan y se vuelve a iniciar todo el proceso.

Como parte del estudio de las características microbiológicas, bioquímicas y sensoriales del tepache se puede decir que el tepache es una bebida tradicional mexicana que se elabora desde las épocas prehispánicas, que ha ido evolucionando, cambiando de una bebida que se elaboraba con maíz y caña de maíz a una combinación de maíz, caña de maíz o de azúcar y piña, hasta dejarla únicamente con restos de frutas y azúcar como se elabora actualmente.

Mediante este estudio se pudo detectar que es una bebida ácida con bajo contenido alcohólico donde pueden participar diversos grupos microbianos entre los que resaltan las levaduras y las bacterias lácticas. Como parte del proceso de fermentación se generan una gran variedad de compuestos volátiles que dan sabor y aroma al tepache y que hacen a la bebida un producto muy aromático, al parecer independientemente de la cantidad de fruta que contenga.

Es una bebida que se consume en casi todo el territorio nacional y sigue siendo una bebida muy popular, el producto sigue elaborándose de manera artesanal y se expende normalmente al menudeo.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que el tepache es una bebida fermentada con una microbiota muy variable.

Un grupo importante fueron las bacterias lácticas, ya que aparecieron en cuenta elevada ($>10^6$) en todas las bebidas analizadas. Especies del género *Lactobacillus* y *Leuconostoc* estuvieron en todas las muestras, habiendo especies homo y heterofermentativas.

Las bacterias acéticas, en las muestras, aparecieron en cantidades considerables ($>10^6$), siendo *Acetobacter spp.* la que se aisló de todas las muestras.

Los productos metabólicos que generan las bacterias acéticas no siempre aparecieron en las muestras analizadas.

De las levaduras sólo *S. cerevisiae* apareció en todas las muestras.

Diferentes especies de los géneros *Hanseniaspora/Kloeckera* y *Candida* se aislaron de tres de las cuatro muestras y todas las levaduras estuvieron en cuentas muy altas ($>10^6$).

Algunos aislados de *Saccharomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* presentaron variabilidad en sus características fenotípicas con respecto a la diagnosis de cada especie.

En algunos de los aislados de las levaduras la secuencia del dominio D1/D2 del gene 26S del ADNr no fue resolutive para identificarlas plenamente por lo que se recomienda el uso de la taxonomía polifásica para establecer si no se tienen especies nuevas.

Dentro de las características bioquímicas se detectaron los productos metabólicos de las bacterias lácticas y de las levaduras, siendo el etanol y el ácido láctico los más abundantes, también apareció ácido acético en cantidades bajas, aunque en la muestra C no se alcanzó a detectar.

Muchos de los compuestos volátiles detectados fueron comunes a todas las bebidas analizadas, algunos de ellos en cantidades relativas altas, muchos de ellos son típicos de bebidas fermentadas.

Otros compuestos volátiles fueron particulares de cada muestra de tepache analizada y aparecieron en menor proporción.

Se detectó un perfil bioquímico bastante complejo con más de 100 compuestos diferentes, lo que indica la riqueza sávida del tepache.

Se estableció en buena medida que el consumidor sigue aceptando el tepache, y además está dispuesto a seguirlo consumiendo y a incrementar su ingesta a medida que haya mayor disponibilidad, lo que es un índice del potencial de industrialización de esta bebida.

Se logró desarrollar el perfil sensorial del tepache con 32 descriptores de apariencia, olor, sabor-aroma y sabor residual que permiten tener la base para establecer la calidad sensorial de la bebida.

El gusto y características que aprecia el consumidor fueron afinados y evaluados mediante el desarrollo de un perfil sensorial. El conocer dicho perfil permitirá generar un producto con los atributos que sean del gusto del consumidor. Este perfil permitió además determinar las diferencias existentes en los procesos con los que se elabora la bebida.

Se estableció que existen diferencias microbianas, fisicoquímicas, bioquímicas y sensoriales entre las bebidas analizadas dependiendo del proceso de fermentación que se sigue.

Al conocer todas las características del tepache se puede iniciar, como de hecho ya se está haciendo, la estandarización del proceso, lo que ayudará más tarde a desarrollar un proceso controlado, primero a nivel de laboratorio utilizando microorganismos seleccionados obtenidos de las muestras analizadas, y cumpliendo con los estándares de calidad fisicoquímica, bioquímica y sensorial, para posteriormente escalarlo a nivel industrial. Con estos resultados se podrá llevar a cabo posteriormente el desarrollo a nivel industrial.

IX PERSPECTIVAS

Como parte de los resultados de este estudio sobre el tepache se puede decir que esta bebida tiene gran potencial en cuanto a su posible industrialización.

Por un lado se detectó una buena aceptación por parte de los consumidores y que puede incrementarse el consumo en la medida que haya más disponibilidad del producto, teniendo como posibles clientes a gente de todas las edades.

Las bases para la industrialización serían:

Se puede manejar entre un 10% y un 20% de mezclas de frutas utilizando cáscara de piña, naranja partida con el jugo extraído y tamarindo prensado con todo y cáscara en proporción 2:1:1.

En el caso de la piña podrán utilizarse subproductos de la industrialización de la fruta.

La constitución del inóculo de la bebida sería con bacterias lácticas como *Leuconostoc mesenteroides* y alguna de las especies de *Lactobacillus* aislada. Levaduras como *S. cerevisiae* y alguna de las especies de *Kloeckera* debido a que estos fueron los microorganismos que aparecieron de manera constante en las muestras analizadas y por los atributos que le confieren a la bebida.

Se podría pensar en un proceso estático por lotes, con un tiempo de fermentación entre 60 y 72 horas de proceso.

Los parámetros de calidad serían una cantidad de etanol máxima de 1%, ácido láctico hasta 0.5% y acético menor a 0.1%. El análisis de compuestos volátiles de la bebida tendría diversos alcoholes, ácidos grasos, ésteres y terpenos para dar

un perfil característico de tepache. Dentro de la evaluación de descriptores deberá ser una bebida de color cobre claro, translúcida con cierta cantidad de partículas suspendidas, de olor y sabor-aroma fermentado intermedio y afrutado, con una acidez baja y dulzor entre 11 y 13 °Brix y bajo sabor residual astringente y amargo.

Una vez fermentado se deberá probar algún sistema de conservación, de preferencia sería dejar a los microorganismos vivos, ya que algunos de ellos pudieran tener actividad probiótica, aunque esto deberá corroborarse. Sino fuera así, podría pasteurizarse y envasarse seleccionando un envase adecuado, que por un lado permita tener un producto estable de larga vida de anaquel, y por otro lo haga atractivo al consumidor con el objeto de que pudiera entrar fácilmente al mercado.

Con todas estas características y los criterios de calidad fisicoquímicos, bioquímicos y sensoriales se puede tener un producto con perspectivas a ser explotado de manera industrial.

X BIBLIOGRAFÍA

Abranches, J., Vital M., Starmer, W. Mendonça-Hagler, L. y Hagler, A. 2000. The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycologia* 92(1): 16-22.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. Y y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389-3402.

A.O.A.C. 1999. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Ed. Patricia Cunniff 16^a edn. Maryland.

Armijo, C., Taboada, J. Lappe, P. y Ulloa, M. 1991. Productos de fermentación por tibicos y levaduras asociadas *Revista Latino-americana de Microbiología* 33: 17-23

A.S.T.M. 1979. *American Society for Testing and Materials. Manual on Consumer Sensory Evaluation*, A.S.T.M. Philadelphia pp. 13-19.

Bardi, L., Crivelli, C. y Marzona, M. 1998. Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Canadian Journal of Microbiology* 44(12): 1171-1176.

Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. 1990. *Yeasts: Characteristics and Identifications*. 2a. edn. Cambridge University Press, Cambridge. pp 997.

Barnett, J. A. Payne, R. W. y Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identifications*. 3a. edn. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1139.

Berger, R. 1995. *Aroma biotechnology*. Springe-Verlag Eds. Berlin pp 139-162.

Berger, R. 1991. *Fruits I* En: Henk Maarse Ed. *Volatile Compounds in Foods Beverages*. Marcel Dekker, Inc Nueva York, p 296.

Berger, R., Drawert, F. y Tiefel, P. 1983. Naturally-occurring flavours from fungi, yeasts, and bacteria. En: Turner, W. B. y Aldridge, D. C. Eds. *Fungal Metabolites*. Academic Press. Londres. pp. 21-32.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986. Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore. pp 1043-1093.

Boehringer. 1998. *PCR Applications Manual*. Boehringer Eds. Mannheim. pp 1-7.

Blanch, P. G., Tabera, J., Sanz, J., Herraiz, M. y Reglero, G. 1992. Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 40: 1046-1049.

Brackett, R.E. 1987. *Vegetables and related products*. En: Beuchat L. Ed. *Food and Beverage Mycology*, 2a ed. AVI publ., Newport. pp 129-154.

Brener, D. J. 1989. *Family I Enterobacteriaceae in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N. y Holt, J. Eds. Williams & Wilkins Baltimore Vol 1 pp 408-506.

Brumann, J. H. 2000. *Alcohol in Ancient Mexico*. The University of Utah Press. Salt Lake City.

Bruning, J. L. y Kintz, B. L. 1977. *Computational Handbook of statistics*. Scott, Foresman and Co. Glenview, ITT 2a edn.

Bruns, T. D., White T. J. y Taylor J. W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecological Systematics*. 22: 525-564.

Cadez, N., Poot, G., Raspor, P. y Smith, M. 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontie* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1671-1680.

Carunchia Whetstine, M. E., Parker, J. Drake, M. y Larick, D. K. 2003. Determining flavor and flavor variability in commercially produced liquid cheddar whey. *Journal of Dairy Science* 86: 439-448.

C.B.S. Centraalbureau voor Schimmelculture, 2004. Base de datos para la identificación de levaduras Holanda. Página web. <http://www.cbs.knaw.nl/>.

Chambers IV, E. y Bowers, J. 1993. Consumer perception of sensory of qualities in muscle foods. *Food Technology* 11: 116-120.

C.O.V.E.C.A. (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). 2002. *Diagnóstico de la cadena de la piña*. Reporte final. Consultoría en Optimización Empresarial S. A. de C. V. México D. F.



Cruz Ulloa, S. y Ulloa, M. 1973. Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 34: 423 -457.

Damasio, M. H. y Costell, E. 1991. Análisis sensorial descriptivo: Generación de descriptores y selección de catadores. *Revista de Agroquímica y Tecnología Alimentaria* 31(2): 165-177.

Deak, T. y Beuchat, R. 1993 Yeasts associated with fruit juices concentrates. *Journal of Food Protection* 56 (9): 777-782.

de Chavez, M., Hernández, M. y Roldan, J. 1992. Tablas de uso práctico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México C.N.A. (Comisión Nacional de Alimentación) I.N.N.S.Z. (Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran) Ed. México: 10A.

De Ley, J., Gillis, M. y Swings, J. 1989. Family VI *Acetobacteraceae* En: Krieg, N. y Holt, J. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Baltimore Vol 1 pp 257-278.

deMann, J. C., Rogosa, M. y Sharpe M. E. 1960 A médium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130.

Deak, T. y Beuchat, L. 1987. Identification of Foodborne Yeasts. *Journal of Food Protection* 50: 243-264.

Drysdale, G. S. y Fleet G. H. 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 39: 143-154.

Durán, L. y Costell, E. 1999. Review: Perception of taste. Physiochemical and psychophysical aspects. *Food Science and Technology International* 5: 299-309.

Engels, W. 2000. Flavour formation by yeasts and moulds. En: *The Rising Power of Yeasts in Science and Industry* Symposium book. Delft University Press. Papendal.

Estrada-Cuellar, J. 1985 Estudio de las levaduras de los tibicos y de la madre del vinagre. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

Fell, J., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. y Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1351-1371.

Feng, P., Weagant S. D. y Grant M. A. 2001. Coliform Bacteria In: Food and Drug Administration Eds. *Bacteriological Analytical Manual*, 6a edn. A.O.A.C., Arlington. pp 5.01-5.07.

Ferreira, V., López, R., Escudero, A. y Cacho, J. 1998. Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *Journal of Chromatography A* 806: 349-354.

Fleet, G. 1997. The wine En: Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. Eds. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. pp 699-721.

Fleet, G. 2000. The Biodiversity of Yeasts in the production of Foods and Beverages. En: *The Rising Power of Yeasts in Science and Industry Symposium book*. Delft University Press. Papendal.

Fonseca, A. Scorzetti, G. y Fell, J. W. 2000. Diversity in the yeasts *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 7-27.

Freitas Schwan, R., Mendonça, A. T., da Silva, Jr. J. J., Rodrigues, V. y Wheals, A. E. 2001. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 89-96.

Gallart, M. Francioli, S., Viu-Marco, A., López-Tamames, E. y Buxaderas, S. 1997. Determination of free fatty acids and their ethyl esters in musts and wines. *Journal of Chromatography A*. 776: 283-291.

García-Romero, E., Pérez-Coello, M., Cabezudo, M. D., Sánchez-Muñoz, G. y Martín-Alvarez, P. J. 1999. Fruity flavor increase of Spanish Airén white wines made by brief fermentation skin contact. *Food Science and Technology International* 5: 149-157.

Gatfield, I. L. 1986. Generation of flavor and aroma components by microbial fermentation and enzyme engineering technology. En: Parliament, T. y Croteau, R. Eds. *Biogenesis of aromas*. American Chemical Society, Washington. pp 310-322.

Gibson, T. y Abd-el-Malek, Y. 1945. The formation of carbon dioxide by lactic acid bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of detecting the process. *Journal of Dairy Research* 14: 35-44.

Godoy, A. 1987. Recopilación bibliográfica sobre los aspectos: histórico, etnobiológico, microbiológico y químico de bebidas alcohólicas no destiladas, indígenas de México. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. pp 14-20.

Gray, P. P. 1951. Some advances in microbiological control for beer quality. *Wallerstein Laboratory Communication* 14: 169-183.

Guerrero, L., Romero, A. Gou, P., Aletá, N. y Arnau, J. 2000. Sensory profiles of different walnuts (*Juglans regia* L.) *Food Science and Technology International* 6(3): 207-216.

Hadrys, H., Balick, M. y Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 6: 227-242.

Hair, J., Anderson, R., Tatham, R. y Black, W. *Multivariate data analysis*. Macmillan Publ. Co. 3a. edn. Nueva York. pp 153-182.

Herrera, T. y Ulloa, M. 1978. Descripción de una especie nueva de levadura *Candida queretana*, aislada de tepache de Queretaro, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 12: 13-18.

Hesseltine, C. W., 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycologia* 59: 149-197.

Hitchins, A. D., Hartman, P. A. y Todd, E. C. 1992. Coliforms–*Escherichia coli* and its toxins En: Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. F. Eds. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. Washington. pp 325-369.

Hodgson, A. y Hodgson, L. 1993. Pineapple juice En: Nagy, S., Chen, C. S. y Shaw, P. Eds. *Fruit Juice Processing Technology*. Agscience, Inc. Auburndale. pp 378-435.

Hopzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. y Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 365S-373S.

Horisberger, M. 1969. Structure of the dextran of the tibi grains. *Carbohydrate research* 10: 379-385.

I.N.E.G.I. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1995. *El Sector Alimentario en México*. Ed. INEGI, México.

I.N.E.G.I. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1997. *Estadísticas sociodemográficas: Estructura porcentual de la población ocupada por grupos de ingreso según entidad federativa*, INEGI. México. Página Web. www.inegi.gob.mx.

I.N.E.G.I. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2000. *Estadísticas sociodemográficas: Salario mínimo general nacional y por área geográfica 1990-2000*, INEGI. México. Página Web. www.inegi.gob.mx.

Iris, J. E. 2004. Los aromas del vino. Los Andes on line. Pagina Web. Losandes.com.ar.

Jolly, N. P. y Pretorius, I. S. 2000. The distribution of Non-*Saccharomyces cerevisiae* Yeasts strains in four wine production regions of the Western cape, South Africa. En: *The Rising Power of Yeasts in Science and Industry* Symposium book. Delft University Press. Papendal.

Johnson, M. y Steele J. 1997. Fermented dairy products. En: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. Eds. American Society for Microbiology. Washington, D. C. pp 605-618.

Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier. Amsterdam.

Kurtzman, C. 1987. Prediction of biological relatedness among yeasts from comparisons of nuclear DNA complementarity. *Studies Mycologie* 30: 459-468.

Kurtzman, C. 1998. Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationships En Kurtzman, C. P. y Fell J. W. Eds. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4a. edn. Elsevier, Amsterdam. pp 63-68.

Kurtzman, C. P. y Fell J. W. Eds. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4a edn. Elsevier, Amsterdam pp 1055.

Kurtzman, C. y Phaff, H. J. 1987. Molecular taxonomy. En Rose A. H. y Harrison J. S. Eds. *The Yeasts Vol. 1 Biology of Yeasts*. Academic Press, Londres. pp 63-94.

Kurtzman C. y Robnett C. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leewenhoek* 73: 331-371.

Kurtzman, C., Robnett, C. y Basehoar-Powers, E. 2001. *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascoporogenous yeast from "Kombucha tea". *FEMS Yeast Research* 1415: 1-6.

Lachance, M. A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 151-160.

Lawless, H. y Heymann, H. 1998. *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*. New York: Chapman & Hall, pp 430-601.

Licker, J. L., Acree, T. E. y Henick-Kling, T. 1999. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor?. En: Waterhouse, A. L. y Ebeler, S. E. Eds. *Chemistry of Wine flavor*. ACS symposium series 714: 95-115.

Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9-13.

López, M. G. 1999. Tequila aroma. En: Shahidi y Ho Eds. *Flavor chemistry of Ethnic Foods* Kluwer Academic. Nueva York. pp 211-217.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 15:155-173.

Lutz, M. L. 1898. Recherches biologiques sur la consitution du tibi. *Comptes Rendus de la Société de Biologie* 5 : 1124-1126.

Lutz, M. L. 1899a. Recherches biologiques sur la consitution du tibi. *Bulletin Trimestriel de la Société de Mycologie Français* 15: 68.

Lutz, M. L. 1899b. Nouvelle recherches sur le tibi. *Bulletin Trimestriel de la Société de Mycologie Français* 15: 167.

MacFaddin, J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. México. pp 1-850.

Mancilla-Margalli, N. y López, M. G. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (4): 806-812.

Martens, M. 1999. A philosophy for sensory science. *Food Quality and Preference* 10: 233-244.

Mascott y Terrés, M. 1952. Contribución al conocimiento de las levaduras de los tibicos del arroz. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. México. p. 60.

Maturin, L. J., y Peeler, J. 2001. Aerobic plate count. In: Food and Drug Administration Ed. *Bacteriological Analytical Manual*, 8a ed. A.O.A.C., Arlington. pp 4.01-4.10.

Meiselman, H. L. 1994. A Measurement Scheme for Developing Institutional Products. In: MacFie, H. J. H. y Thomson, D. M. H. Eds. *Measurement of Food Preferences*. Glasgow: Blackie Academic and Professional. pp 1-23.

Mehlman, I., Wallace, A. y Wentz, B. 1984. Coliform Bacteria In: Food and Drug Administration Eds. *Bacteriological Analytical Manual*, 6a ed. A.O.A.C., Arlington. pp 5.01-5.07.

Mesas, J. M. y Alegre, M. T. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Revista de ciencia y Tecnología de alimentos* 2(4): 174-183.

Mislevic, P. B., Beuchat, L. R. y Cousin M. A. 1992. Yeasts and Molds. En: Vanderzant C. y Splittstoesser D. F. Eds. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. pp. 239-249.

Moinas, M., Horisberger, M. y Bauer H. 1980. The structural organization of the tibi gains revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Archives of Microbiology* 128:157-161.

Moreno-Terrazas, R., Reyes-Morales, H. Huerta-Ochoa, S., Guerrero-Legarreta, I. y Vernon-Carter, E. J. 2001. Consumer awareness of the main sensory attributes of tepache a traditional fermented fruit beverage. *Food Science and Technology International* 7(5): 411-416.

Moreno y Diaz, M. P. 1932 Contribución al estudio bacteriológico y análisis químico del vinagre que produce el tibico. Tesis profesional, Escuela Nacional de Ciencias Químicas, UNAM, México, D. F. 36 pp.

Moskowitz, H. R. 1994. Product optimization. En MacFie, H. J. y Thomson, D. M. Eds. *Measurement of food preferences*. Blackie Academic and Professional, Glasgow. pp 97-136.

Moskowitz, H. R. 1995. Food Quality: conceptual and sensory aspects. *Food Quality and Preference* 6: 157-162.

Muñoz, A. 1999. Aspectos Críticos en el Diseño de Pruebas con Consumidores. *Memorias II Simposio Iberoamericano de Análisis Sensorial*, SENSIBER Universidad Iberoamericana, México. pp 71-88.

Muñoz, A. y Chambers IV, E. 1993. Relating Sensory Measurements to Consumer Acceptance of Meat Products. *Food Technology* 47(11): 128-134.

Nava Garduño, D. 1953. Contribución al estudio de las levaduras del tepache, Tesis Profesional. Facultad de Ciencias UNAM, México. p 51.

Nieto, E. y Vázquez, E. 1993. Las fermentaciones tradicionales del maíz, resultados de una encuesta. En: Wachter, C. y Lappe, P. Eds. *Alimentos fermentados indígenas de México*. UNAM pp 47-52.

Pastor, M. V., Costell, E., Izquierdo, L. y Durán, L. 1996. Sensory Profile of Peach Nectars. Evaluation of Assessors and Attributes by Generalized Procrustes Analysis, *Food Science and Technology International* 2:219-230.

Pedrero, F. D. y Pangborn, R. M. 1989. *Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analítico* Ed. Alhambra mexicana. México. pp 63-107.

Peterson, S. W. y Kurtzman, C. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 14:124-129.

Pidoux, M. 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the ginderbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal* 5: 415-420.

Piggott, J., Simpson, S. y Williams, S. 1998. Sensory analysis. *International Journal of Food Science* 33: 7-18.

Ramey, D. y Ough, C. 1980. Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 28: 928-934.

Robbs, P. G., Hagler, A. N. y Mendonça-Hagler, L. C. 1989. Yeasts associated with pineapple plantation in Rio de Janeiro. *Yeast* 5: 485-489.

Rodas, A. M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:197-207.

Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P. y Fatichenti, F. 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 239-242.

Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., y Ulloa, M. 1993. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tибicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 35: 19-31.

Ruiz-Oronoz, M. 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente como tибicos. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 3: 183-190.

Sánchez-Marroquín, A. 1977. Mexican pulque a fermented drink from *Agave* juice. *Symposium on Indigenous Fermented Foods*. Bangkok.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of Natural Academy of Science* 74: 5463-5467.

Santamaría, F. J. 1942. *Diccionario general de americanismos*. 3 volúmenes, Pedro Robredo. México.

Santamaría, F. J. 1959. *Diccionario de mejicanismos*. Porrúa. México, p 274.

Sanz, Y., Collado, M. C. y Dalmau, J. 2003. Prebióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española* 61(9): 476-482.

Sharpe, M. E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. En: F.A. Skinner y D.W. Lovelock Eds. *Identification Methods for Microbiologists*. Academic Press. London. pp 233-259.

Scharpf, L., Seitz, E., Morris, J., y Farbood, M. 1986. Generation of Flavor and Odor compounds through fermentation processes. En: Parliament T. y Croteau R. Eds. *Biogeneration of Aromas*. American Chemical society, Wasington pp 323-346.

Shaw, P. 1991. *Fruits II* en: Henk Maarse Ed. *Volatile Compounds in Foods Beverages*. Marcel Dekker, Inc Nueva York. pp 305-327.

Shutz, H. G. 1994. Appropriateness as a Measure of Cognitive-Contextual Aspects of Food Acceptance. En: Macfie H. J. H. y Thomson D. M. H. Eds. *Measurement of Food Preferences*. Blackie Academic and Professional, Londres. pp 25-49.

Siret, F. y Issanchou, S. 2000. Traditional process: influence on sensory properties and on consumers' expectation and liking Application to "pâte de campagne". *Food Quality and Preference* 11: 217-228.

Smith, M. Th. 1998. *Hanseniaspora*. En: Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. Eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4a edn. Elsevier, Amsterdam. pp 214-220.

Stampanoni, Ch. R. 1993. Influence of Acid and Sugar Content on Sweetness, Sourness and the Flavour Profile of Beverages and Sherbets. *Food Quality and Preference* 4: 169-176.

Stampanoni, Ch. R. 1997. The use of standardized flavour languages and quantitative flavour profiling technique for flavoured dairy products. En: Gacula, M. C. Jr. Ed. *Descriptive sensory analysis in practice*. Food & Nutrition Press Inc. Trumbull. pp 235-252.

Steinkraus, H. K. 1996. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Microbiological Series No. 9. 2ª. Ed. Marcel Dekker. New York.

Stiles, M. E. y Hopzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

Stone, H., Sidel, J. y Bloomquist J. 1980 Quantitative Descriptive Analysis. *Cereal Food World* 25 (10): 642-644.

Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey A. y Singleton, R. 1974. Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology* 28(11): 24-34.

Swanson, K. M., Busta, F. F., Peterson, E. H. y Johnson, M. G. 1992. Colony count methods. En: Vanderzant C. y Splittstoesser D. F. Eds. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. Washington. pp 75-95.

Ulloa, M. y Herrera, T. 1979. Aspectos generales sobre etnología, microbiología y química de bebidas fermentadas indígenas de México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 39.

Ulloa, M. y Herrera, T. 1981. Estudio de *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen partes de las zoogreas llamadas tibicos en México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 16: 63-75.

Ulloa, M. y Herrera, T. 1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: Pozol, Tesgüino, Pulque, Colonche y Tepache. *Anales del Instituto de Biología UNAM* (1976-1982): Serie Botánica 47-53: 145-153.

Ulloa, M., Herrera, T. y Lappe, P. 1987. Fermentaciones tradicionales indígenas de México. México: Instituto Nacional Indigenista, *Serie de Investigaciones Sociales* 16: 33-39.

van der Walt J. P. & Yarrow D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. En: Kreger-van Rij, N. J. W. Eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 3a edn. Elsevier, Amsterdam. pp 45-104.

Vaughan-Martini, A. y Martini, A. 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 77-84.

Vaughan-Martini, P., Angelini, D. y Cardinali, G. 2000. Use of conventional taxonomy electrophoretic kariotyping and DNA-DNA hybridization for the classification of fermentative apiculate yeasts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1665-1672.

Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. y Owens, D. 2000. Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 17: 251-256.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. En: Kurtzman C. P. y Fell J. W. Eds. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 4a edn. Elsevier. Amsterdam. pp 77-110.

Zook, K. y Wessman, C. 1997. The selection and use of judges for descriptive panels. En: M. G. Gacula Jr. ed. *Descriptive sensory analysis in practice*. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull. pp 35-50.