



Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos



Dirección General de Institutos Tecnológicos

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.

Ingeniería Bioquímica

REPORTE DE RESIDENCIA:

Elaboración *in vitro* de una bebida tipo “taberna”

PRESENTA:

Bermúdez Hernández Ingrid Darney

ASESOR:

Dr. Miguel Abud Archila

REVISORES:

M.C. Lucía María Cristina Ventura Canseco

Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

ÍNDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ.....	6
5. PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS	6
6. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	6
7. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
Antecedentes.....	6
7.1 <i>Acrocomia aculeata</i>	7
7.1.1 Usos de la palma <i>Acrocomia aculeata</i>	8
7.1.2 Taberna.....	9
7.1.2.1. Definición y propiedades.....	9
7.1.2.2. Proceso de obtención de la “taberna”.....	11
7.1.2.3. Condiciones de fermentación.....	12
7.1.2.4. Microorganismos involucrados en la fermentación	13
7.2. Generalidades del género <i>Saccharomyces</i>	17
7.2.1. Características del cultivo	18
7.2.2. Características morfológicas.....	18
7.2.3. Características bioquímicas y fisiológicas	18
7.2.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21

7.2.4.1 Fermentación alcohólica	22
7.3.Generalidades del género <i>Zymomonas</i>	23
7.4.Generalidades de las bacterias Lácticas	26
7.5.Generalidades de las bacterias Acéticas.....	32
7.6. Obtención de bebidas fermentadas	39
7.6.1. Efecto del pH y temperatura	40
7.6.2. Efecto de la composición del medio de cultivo.	40
7.7 Evaluación sensorial.....	41
7.8. Jueces.....	46
7.9. Pruebas sensoriales	47
7.9.1. Pruebas dúo o trío	50
7.9.2. Pruebas hedónicas	50
8. PROCEDIMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	51
9. RESULTADOS.....	54
10. CONCLUSIONES	59
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. INTRODUCCIÓN

El vino de palma, es una bebida fermentada obtenida de diferentes tipos de árboles de palma, tal como la palma de aceite (*Elaeis guineensis*), *Raffia* (*Raphia hookeri*) y otras especies; su composición rica en nutrientes sirve como un buen medio para el crecimiento de numerosos microorganismos como bacterias y levaduras (Bechem *et al.* 2007).

La “taberna” es obtenida de la palma *Acrocomia aculeata*, mejor conocida como palma de coyol. Esta palma está distribuida a lo largo de las planicies costeras del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas, se encuentra específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco (Zuart, 1999). Tiene diversos usos, pero sin duda alguna, el producto más cotizado de la palma de coyol y por el que más se le conoce es la “taberna”, bebida fermentada embriagante blanquizca, de gran aceptación entre la población local por su exquisito sabor, más fino y delicado que el pulque (Rodríguez, 2008). La taberna, aparte de ser una bebida reconocida por los chiapanecos, debido a su sabor característico, se le ha reconocido por tener propiedades medicinales.

La taberna juega un papel importante como bebida alcohólica, por lo que es importante determinar los aspectos microbiológicos de su fermentación. Amoa-Awua *et al.* (2007) analizaron los cambios biológicos y microbiológicos en el vino de la palma y encontraron que levaduras y bacterias ácido lácticas (LAB) fueron importantes durante el proceso de fermentación, mientras que las bacterias ácido acéticas (AAB) son las causantes del desarrollo del sabor a vinagre.

La evaluación sensorial es el análisis de alimentos u otros materiales por medio de los sentidos. Ésta es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos, etc. Las pruebas sensoriales son utilizadas en diversas industrias como la alimentaria, la farmacéutica, la industria de pinturas y tintes (Anzaldúa, 1988).

2. JUSTIFICACIÓN

El aprovechamiento de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) para la producción de “taberna” en el Estado de Chiapas, ha provocado una disminución considerable en la población de dicha especie, aunado a su lento crecimiento y a su dificultad para su reproducción. Por ello, es importante investigar posibles alternativas para la elaboración de una bebida tipo taberna, que tenga características sensoriales similares y que a su vez evite la tala de la palma de coyol.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los microorganismos y del consorcio microbiano sobre las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de una bebida tipo “taberna”.

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar fisicoquímicamente y microbiológicamente la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*).

Obtención del medio de cultivo sintético para la elaboración de la bebida “tipo taberna”.

Evaluar el efecto de los consorcios microbianos durante la fermentación sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la taberna.

Realizar la evaluación sensorial a la bebida “tipo taberna”.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, específicamente en el laboratorio de investigación del área de posgrado. Este laboratorio cuenta con el material requerido para realizar los experimentos programados como: balanzas analíticas y granatarias, cámaras de refrigeración, incubación, microscopios, autoclaves, reactivos, etc.

El entrenamiento de jueces para la evaluación sensorial se realizó en el laboratorio de alimentos y cuenta con material de cristal, balanzas analíticas y granatarias, cámaras de refrigeración, autoclaves, reactivos, etc.

5. PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS

Evitar la tala de la palma ya que ha sido impactada para el aprovechamiento de la taberna, palmito y la fruta que se hace en dulce.

Llevar a cabo una fermentación controlada para que se disminuyan los riesgos de contaminación que se generan en una fermentación espontánea.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

El proyecto se realizó en el laboratorio de investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. En dichos experimentos se tuvo la dificultad de elaborar el medio de cultivo adecuado para que se llevara a cabo la fermentación, como también la falta del equipo que no permitió la caracterización de la savia, por lo que los objetivos específicos fueron cumplidos parcialmente.

7. FUNDAMENTO TEÓRICO

Antecedentes

La taberna es obtenida de la palma *Acrocomia aculeata* mejor conocida como palma de coyol. Su nombre deriva del Náhuatl “coyoli”, que significa “cascabel” y antiguamente se le conocía como “cuauhcoyolli” o sea árbol de cascabeles, ya que al agitar el fruto seco, éste produce un sonido semejante (Cabrerá, 1991). A.

aculeata es conocida como “coyol” en Sinaloa, Yucatán y norte de Chiapas, como “coquito baboso y coyol” en Oaxaca, Veracruz y en el centro y costa de Chiapas y como “map” en San Luis Potosí.

7.1 *Acrocomia aculeata*

A. aculeata es una palma que alcanza una altura de aproximadamente 15 m y 40 cm de diámetro, se caracteriza por tener en su tallo espinas negras que pueden llegar a alcanzar los 7 cm de longitud y que se disponen principalmente en la parte superior del mismo.; presenta hojas pinnado compuestas y las flores se encuentran en una panícula (Figura 1). Los frutos son nueces globosas, ligeramente comprimidas, su cáscara es amarillo verdosa, dura y delgada; la pulpa es muy fibrosa y escasa, de color pardo amarillenta, la cubierta de la semilla es de color negro, también dura, contiene un endospermo, el cual es rico en aceite. Fructifica de Septiembre a Noviembre (Miranda 1975).

Como otras palmas, esta especie es perennifolia (presenta hojas durante todo el año), pero las hojas viejas no caen inmediatamente, permaneciendo colgadas por un tiempo más o menos largo, lo que da la impresión de que la palma se está secando (Mc Currach, 1977).

Esta palma se encuentra distribuida a lo largo de la planicie costera del Golfo de México y del Pacífico; en Chiapas, se encuentra específicamente en la región de la Frailesca, Centro y el Soconusco (Zuart, 1999).

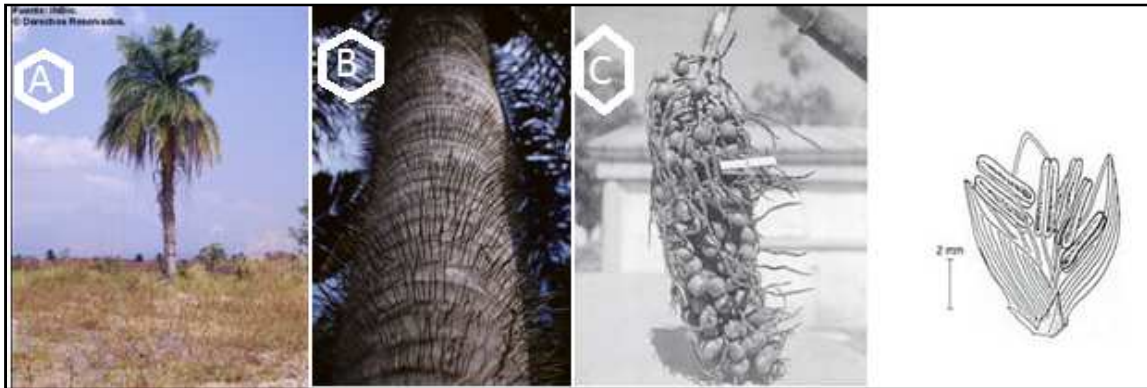


Figura 1. A) *Acrocomia aculeata* o palma de coyol, B) detalle de las espinas del tallo, C) detalle de los frutos.

7.1.1 Usos de la palma *Acrocomia aculeata*

A. aculeata tiene diversos usos: con el fruto sin cáscara se pueden elaborar dulces con azúcar o panela; con el mucílago o baba del coyol revuelta con harina se preparan obleas; las flores frescas se consumen cocidas y combinadas con huevo; también son vendidas como ornato, especialmente para el arreglo de altares. La almendra contiene un aceite de baja calidad que no se industrializa, sin embargo es usado en medicina tradicional, ingerido y aplicado directamente, tiene propiedades analgésicas; la raíz es usada como remedio contra la diabetes y la ingestión de la savia tiene propiedades digestivas y diuréticas.

En Guatemala, la parte dura de la nuez es usada para fabricar artesanías como anillos y rosarios; las hojas y el tallo se emplean como materiales de construcción rústica (Maldonado, 1992). Cuando la palma se encuentra en floración, es visitada por las abejas considerándose importantes como planta melífera.

Pero sin duda alguna, el producto, más cotizado de la palma de coyol y por el que más se le conoce es la “taberna”, bebida fermentada embriagante blanquizca, de gran aceptación entre la población local por su exquisito sabor, más fino y delicado que el pulque.

7.1.2 Taberna

7.1.2.1. Definición y propiedades

En México, la “taberna” es una bebida alcohólica tradicional producida por la fermentación natural de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) misma que se asemeja al “vino de palma” de África (Alcántara *et al.*, 2010), ésta es consumida en gran parte de la población de las regiones de la sierra madre de Chiapas.

Es una bebida alcohólica, blanca, ligeramente espesa y sobre todo muy refrescante. Se obtiene de la fermentación espontánea de la savia del tallo de la palma de coyol en los meses de Marzo y Abril cuando el calor es sofocante y se requiere de bebidas frescas, incluso se le atribuyen propiedades medicinales para: desinflamar, cicatrizar úlceras, tratamientos de vesícula, próstata y como laxante (*vox populi*). No obstante, hasta el momento se desconocen los agentes microbiológicos o bioquímicos, que le confieren estas características.

Estas propiedades “curativas” de la taberna no son de sorprender ya que otras bebidas fermentadas también son empleadas para beneficios similares, principalmente con los relacionados con el sistema digestivo o como un suplemento alimenticio, ya que contienen proteínas, vitaminas y un bajo contenido de grasas, además de que la fermentación que producen son láctica, alcohólica y acética, contando con la presencia de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias de las especies de *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Estas últimas, están comprendidas dentro de un grupo muy importante de microorganismos, llamadas bacterias ácido lácticas (BAL) ya que aportan beneficios a la salud del consumidor.

Los efectos de la “taberna” puede incluir mareo y debilitamiento, este último se caracteriza por que quien la ingiere no puede sostenerse en pie aun cuando se sienta sobrio.

Balick (1990) evaluó el vino de palma de coyol para conocer si se encontraba presente algún otro componente nutricional útil en este vino. Reportando un contenido de alcohol del 12.86%, además de la presencia de diversos minerales, haciendo hincapié en la concentración de potasio, desde el punto de vista nutricional (tabla 1). Si el análisis se calcula sobre una base peso seco, aumenta el contenido de proteína, pero no lo suficiente para considerar el vino de coyol como un alimento nutritivo.

Cuadro 1. Análisis del vino de coyol

pH	4.0
Alcohol	12.86%
Brix	16%
Proteínas	0.61%
Fosforo	38 ppm
Sodio	24 ppm
Calcio	142 ppm
Magnesio	57 ppm
Hierro	2.5 ppm
Manganeso	0.5 ppm
Cobre	0.9 ppm
Zinc	0.2 ppm
Potasio	2540 ppm

7.1.2.2. Proceso de obtención de la “taberna”

La “taberna” o vino de coyol se extrae de árboles adultos, esto quiere decir que la palma debe de tener una edad de 15 años como mínimo para que llegue el momento en que se pueda cortar para la extracción del líquido. Las palmas que pueden ser maniobradas en posición horizontal son elegidas para el corte. Esto es necesario para permitir el máximo flujo de la savia (Figura 2).



Figura 2. Tallos de la palma de coyol para la obtención de la taberna

El proceso para producir la taberna consiste en tirar la palma de coyol arrancándola desde la raíz, se le quita todas las hojas y en la parte del “cogollo” (palmito) se le hace un incisión en forma rectangular de 10 cm de ancho por 15 cm de largo y de aproximadamente unos 30 centímetros de profundidad, ésta es denominada “canao” (Figura 3) y se espera a que brote la savia del árbol. Es importante no cortar demasiado por debajo del palmito, ya que esto limita el flujo máximo de la savia. La cavidad hay que cubrirla con un pedazo de tabla o cartón para dejar que el líquido brote, la savia se recoge dos veces al día de la mayoría de los árboles, el flujo de la savia de las palmeras recién cortadas es tan fuerte que la recolección puede llegar a realizarse hasta tres veces durante los primeros

días. Este líquido es un agua-miel dulce con sabor a agua de coco que se fermenta rápidamente.

Es necesario vaciar y raspar todos los días esta cavidad para que la savia siga drenando, obteniéndose un promedio de 2 a 4 litros de taberna diarios por cada palma durante aproximadamente dos meses (proceso dependiendo del tamaño del árbol). La savia colectada generalmente se coloca en depósitos en donde continúa la fermentación.

La mayoría de los árboles son talados por la mañana, se dejan fermentar naturalmente por 24 horas, éste proceso es conocido como “hirviendo” o “ebullición del vino” (Balik, 1990).



Figura 3. Elaboración de taberna. A) Corte del tallo de *A. aculeata*;
B) Canoa de drenaje de la savia.

7.1.2.3. Condiciones de fermentación.

El vino de palma se presenta como un líquido blanquecino por fermentación natural de la savia (Uzogara *et al.*, 1990; Uzochukwuru *et al.*, 1991). La savia sin fermentar es limpia, dulce, es un jarabe incoloro que contiene alrededor de 10 al 12% de azúcar, de lo cuál principalmente es sacarosa (Bassir, 1962; Okafor, 1975 a). En la fermentación por la flora microbiana natural, el nivel de azúcar disminuye rápidamente a medida que se convierte en alcohol y otros productos (Obire, 2005) mientras que la savia se vuelve de color blanco lechoso debido a que la

suspensión microbiana aumenta como resultado del crecimiento prolífico de los organismos fermentadores (Okafor, 1975a,b). El pH de la taberna al final del proceso de fermentación es aproximadamente de 3.5 (Escalante *et al.*, 2008).

La fermentación del vino de palma se puede describir en tres niveles o como en 3 etapas de fermentación. El primer nivel tiene lugar en el receptáculo de corte en la palma en sí, esto ocurre como un proceso de fermentación de cultivo continuo, aunque el recolector de vino de palma periódicamente perturba la población microbiana en el fermentador biológico (un semi-continuo). El segundo nivel se produce cuando el vino de palma se acumula en el recipiente colocado bajo el árbol. La acumulación de alcohol en el recipiente es más rápido que en el tronco del árbol, porque no hay pérdida del producto, aunque hay dilución continua de los contenidos por el goteo del jugo de la fermentación. El más alto nivel de acumulación de alcohol ocurre durante la distribución y mercadeo. Esta tercera etapa de la fermentación se produce como un proceso por lotes en condiciones más anaeróbicas, que favorecen a la fermentación por las levaduras (Amoa-Awua *et al.*, 2006).

7.1.2.4. Microorganismos involucrados en la fermentación

El vino de palma obtenido de la savia de diversas especies de palmas es una bebida común en diversas partes de África y Asia (Balik, 1990). La presencia de varios microorganismos especialmente bacterias y levaduras son responsables de la fermentación del vino de palma (Bassir, 1962; Faparusi, 1966; Okafor, 1977). Durante la fermentación, los azúcares en la savia de la palma son metabolizados a alcohol y ácidos orgánicos (Okafor, 1975b).

El vino de palma es producido por la fermentación de la savia de plantas tropicales de la familia *palmae* y es consumido en grandes cantidades en el sureste de Nigeria. Contiene componentes nutricionales importantes, incluyendo aminoácidos, proteínas, vitaminas y azúcares (Okafor, 1987). Esto hace de este vino un medio verdadero para el crecimiento de un consorcio de microorganismos,

cuyo crecimiento, puede modificar las condiciones físico-químicas del vino, dando lugar a la competencia y sucesión de organismos. Muchos trabajos han llevado a cabo estudios destinados al aislamiento de las levaduras y la explotación del vino de palma para su proceso industrial. La producción de etanol portátil y la producción de proteína unicelular.

La savia de la palma se ha demostrado que es un medio rico capaz de soportar el crecimiento de varios tipos de microorganismos, como gran número de mesófilos aerobios, bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas fueron encontradas en el vino de palma durante la intervención de los árboles de palma. La concentración de alcohol en las muestras de vino de palma resultaron ser bajos y depende de varios factores, incluyendo a la naturaleza y al tipo de fermentación.

Amoa-Awua *et al.* (2006) evaluaron el contenido microbiológico y bioquímico del vino de palma de aceite (*Elaeis guineensis*) determinados durante la intervención y su almacenamiento durante 5 semanas. *Saccharomyces cerevisiae* fue la única especie aislada de las muestras. *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* fueron denominadas como bacterias ácido lácticas, mientras que las bacterias del ácido acético se aislaron después del tercer día cuando los niveles de alcohol eran considerables. El pH, las concentraciones de ácido láctico y ácido acético durante el drenado se encuentran entre 3.5-4,0%, 0.1-0.3% y 0.2-0.4% respectivamente, mientras que el contenido de alcohol de las muestras recogidas durante el día tenían entre un 1.4% y 2.82%, el vino de palma que se había acumulado durante la noche, un 3.24% a 4.75%; y la palma de vino almacenada durante 24 horas, más de 7.0%. El pH confirma la importancia de las bacterias ácido lácticas en la fermentación del vino de palma.

En Nigeria las dos fuentes principales de vino de palma son *Elaeis guineensis* y *Rhaphia hookeri* y la palma de aceite. El vino de palma es una bebida efervescente de color blanco lechoso, estas propiedades se deben a la presencia de microorganismos vivos como bacterias y levaduras (Okafor, 1975a,b), su

agradable sabor dulce se pierde pronto y se sustituye por acidez causada por la acción bacteriana.

Ogbulie *et al.* 2007 estudiaron la flora microbiana presente de las dos especies de palma (*Elaeis guineensis* y *Rhaphia hookeri*), los cambios bioquímicos asociados con la fermentación de la savia y el efecto de los conservadores tradicionales asociados a la vida de anaquel de los productos. Los análisis microbiológicos revelaron que bacterias heterótrofas y coliformes fueron obtenidas de las muestras de *R. hookeri*, mientras que de la palma *E. guineensis* se aislaron principalmente levaduras. La incidencia media de los géneros bacterianos y levaduras reveló un fuerte aumento de 0 a 72 h por las bacterias heterótrofas totales, mientras que los coliformes y las levaduras mostraron un progresivo aumento del tiempo 0 h de fermentación a las 48 h seguida de una disminución fuerte se observada a las 72 h. Esta tendencia sigue el mismo orden hasta que los signos de deterioro de las muestras del vino de palma fueron observadas. Las pruebas de identificación en la palma *E. guineensis* revelaron el aislamiento de más géneros de bacterias como *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium* y *Staphylococcus*, mientras que especies de *E. coli* y *micrococcus* con la excepción de *Brevibacterium sp*, fueron obtenidos de *R. hookeri*. El recuento de heterótrofos totales y el nivel de pH se observó que disminuían mientras avanzaba la fermentación. Fue determinada la evaluación sensorial de las propiedades del vino de palma empleando conservadores naturales (*Saccoglottis gabonensis*, *Vernonia amygdalina*, *Euphobia sp.*, *Nauclea sp.* y *Rubiaceae sp*) y sin conservadores. El nivel de inhibición exhibido por los extractos de las plantas conservadas en los aislados revelaron que los extractos acuosos de las plantas no inhibieron el crecimiento, mientras que el extracto etanólico de las plantas mostró una inhibición evidente excepto *Euphobia sp.* y *Nauclea sp.*, que no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre *Bacillus sp.*

Alcántara *et al.* (2010) identificaron a los microorganismos durante la fermentación de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata*), al inicio de la fermentación se encontraron *Zymomonas mobilis*, *Fructobacillus sp*, *Pantoea agglomeran*, a las 60h se encontraron bacterias ácido lácticas relacionadas a *Lactobacillus nagelii*, *L.*

suciola y *L. sp.* y al final de la fermentación, 108 h después se encontró una comunidad bacteriana que incluía *Z. mobilis*, *Lactobacillus nagelii* y *Acetobacter pasteurianus*. En éste reporte, sugirieron que *Zymomonas mobilis* representa una proporción muy importante en la comunidad bacteriana (60-80%), así como, *Lactobacillus nagelii* durante el proceso de fermentación de la taberna. Los resultados de la investigación de la composición de la diversidad bacteriana fue baja durante en el inicio de la fermentación y disminuyó mediante el proceso de ésta.

La savia de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) sirve como sustrato para el crecimiento de distintos microorganismos. En varios países de África, la savia de la palma se aprovecha y es sometida a fermentación espontánea, lo que permite la proliferación de varias especies de levaduras para convertir el sustrato dulce en una bebida alcohólica.

En diversas sociedades africanas, el vino de palma juega un papel importante en las prácticas habituales, especialmente la de productos destilados del vino de palma. Debido al papel central que las bebidas alcohólicas han jugado en la sociedad tradicional, es importante que la microbiología y la bioquímica del proceso de fermentación se conozcan bien (Okafor, 1972; Hartley, 1984)

Au Du (2010) produjo vino a partir de fermentación espontánea y controlada usando el jugo de marañón. Los microorganismos involucrados en la fermentación espontánea fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae var ellipsoideus*, *Rhodotorula sp*, *Candida sp*, *Lactobacillus brevis*, *Gluconobacter oxydans* y *Klebsiella aerogenes*. En la fermentación controlada el jugo fue mejorado con *S. cerevisiae var elipsoideus*. El monitoreo químico del proceso de fermentación mostró que el contenido de azúcares del jugo disminuyó de 7.5 a 1.7% en la fermentación espontánea y de 15.0 a 3.0% en la fermentación controlada. También hubo un aumento constante en el contenido de alcohol del jugo de 1.77 a 6.72% en la primera y de 2.04 a 7.70% en la segunda. El análisis de los vinos mostró que contiene proteínas, vitamina A y C, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico y azúcares reductores. Los resultados de la evaluación sensorial mostraron

que el vino controlado fue superior al vino con fermentación espontánea en sus propiedades organolépticas y de conservación. Los valores del contenido de alcohol y de azúcar del vino elaborado bajo condiciones controladas, 8.30 y 3.0% (15 g/l) respectivamente, se encuentran dentro de las especificaciones estándares para los vinos de mesa.

El monitoreo químico y microbiológico mostró que hubo disminución general en pH, azúcares totales y gravedad específica así como el incremento de alcohol, recuento de levaduras y la acidez del mosto de fermentación con mayor tiempo de incubación. Esto es una afirmación de que el azúcar fue utilizado por las levaduras (Adeoye *et al.*, 1991; Ikenebomeh y Madagwu, 2001). La aireación por 24 h pudo haber contribuido al crecimiento de levaduras ya que el oxígeno aumenta la síntesis de la membrana y esteroides necesarios para el crecimiento (Maldonado *et al.*, 1975).

7.2. Generalidades del género *Saccharomyces*

Desde hace tiempo existe un acuerdo general en denominar levaduras a los hongos que presentan predominantemente carácter unicelular. La reproducción vegetativa tiene lugar habitualmente por gemación. Muchos hongos pueden presentar dos fases: micelial y unicelular. Las levaduras solo se presentan en forma de células aisladas ó como pseudomicelios. Se reproducen por ascosporas o sólo asexualmente por gemación o división binaria. Las características generales de las levaduras por las que se las diferencia entre sí son más bien fisiológicas que morfológicas. En observación microscópica se las distingue a primera vista de las algas por no poseer pigmentación verde, de los protozoos por presentar pared rígida y ser inmóviles, y de las bacterias por presentar un tamaño mucho mayor.

Las levaduras se siguen considerando separadamente de los hongos en función de su mayor actividad metabólica ($\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), de su crecimiento más rápido y de su mayor efectividad como biocatalizadores. Su manipulación en el laboratorio es similar a la de las bacterias y puede aplicarse a ellas el principio del cultivo puro. Su distribución en la naturaleza es parecida a la de las bacterias (Rose y Harrison, 1969).

7.2.1. Características del cultivo

Cuando se desarrollan en medios de cultivo adecuados, las colonias de levaduras varían en aspecto, textura y margen, como las bacterias. Así, algunas son lisas, otras rugosas; algunas son aplanadas, otras elevadas; tienen bordes bien definidos o irregulares. Las colonias jóvenes tienen consistencia comparable a la de una pasta, la cual con el tiempo, se vuelve más espesa y seca. Pueden producir pigmentos. El tipo de desarrollo en caldo de cultivo también proporciona información significativa. Algunas colonias se desarrollan en el fondo del líquido a manera de sedimento, otras crecen uniformemente en todo el caldo y otras crecen sólo en la superficie como una película o nata (Pelczar, 1993).

7.2.2. Características morfológicas

En general, las células de las levaduras son más grandes que las de la mayor parte de las bacterias, pero las más pequeñas no son tan grandes como las bacterias mayores. Las levaduras varían considerablemente de tamaño, pudiendo tener entre 1 y 5 μm de ancho por 5 a 30 μm o más de largo. Generalmente son ovoides, si bien algunas son esféricas y otras alargadas (Pelczar, 1993). Cada especie tiene un aspecto característico, pero aún en cultivos puros existen variaciones considerables de tamaño y forma de las células individuales, dependiendo de la edad y el medio en que se encuentran. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción.

7.2.3. Características bioquímicas y fisiológicas

Mientras que las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género, las características bioquímicas permiten definir la especie de la levadura. Las levaduras necesitan los mismos elementos químicos que otras formas de vida: carbón, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre y molibdeno. El carbono, suele

obtenerse de azúcares, ácidos orgánicos, aldehídos y glicerina, el cual es oxidado con la producción de energía para síntesis y otros fenómenos vitales. El nitrógeno se obtiene de productos de la hidrólisis de proteínas: proteasas, peptonas, aminoácidos y amoníaco ó urea ó amidas. En los medios de cultivo como fuente de nitrógeno encontramos los sulfatos, fosfatos o cloruro de amonio.

En términos generales, las levaduras necesitan un poco más de agua que los mohos, pero menos que las bacterias. Entre las levaduras hay una gran variación; algunas especies crecen en medios que contienen 40% de agua (miel y jaleas o compostas). El catabolismo de azúcares como la glucosa, es anaerobio (fermentación) o aerobio (respiración). El proceso más típico es el catabolismo anaeróbico, también conocido como fermentación alcohólica. Los productos finales son alcohol etílico y dióxido de carbono:



En condiciones aerobias, el catabolismo supone la utilización del oxígeno atmosférico para varios caminos posibles. En la respiración, la oxidación completa de la glucosa produce dióxido de carbono y agua mientras que la oxidación incompleta da lugar a la acumulación de ácidos y otros productos intermediarios (Pelczar, 1993).

Sin embargo, son de importancia práctica para la investigación, los productos como alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres, glicerol y aldehídos. La reacción de fermentación es anaeróbica y si los cultivos se airean durante el desarrollo, la fermentación se reprime a favor de las vías oxidativas. Antes de que un cultivo de levaduras pueda fermentar ciertos di, tri y polisacáridos, éstos primero tienen que ser hidrolizados por enzimas (hidrolasas) y como el tipo de hidrolasas que producen las levaduras varían con el género o especie, esta propiedad sirve para diferenciarlas. Las levaduras son fuente rica de otras enzimas como lactasa, invertasa y catalasa, las cuales tienen importancia comercial.

De manera similar, en el proceso respiratorio hay diferencias en los compuestos que pueden ser asimilados por varias especies de levaduras (Tabla 2). Algunas utilizan pentosas (D-xilosa, D-ribosa); polisacáridos (almidón); alcoholes de azúcar (manitol, sorbitol); ácidos orgánicos, como el láctico, acético, cítrico y algunos otros sustratos orgánicos.

Las levaduras son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0 a 47° C; algunas no se desarrollan a más de 15° C , aunque otras pueden hacerlo a mucho menores temperaturas. La óptima para la mayor parte de ellas está entre 20 y 30° C (Pelczar, 1993). La incubación a 30° C suele ser satisfactoria. Se obtienen grandes cantidades de células o bien de alcohol etílico algo menores, dado que el efecto inhibitorio de los productos tóxicos de desecho que se acumulan en el medio aumenta con la temperatura. Este factor tiene interés en la elaboración comercial de levadura. Las variedades patógenas crecen bien entre 30 y 37 °C.

En general, se sostiene que las levaduras se desarrollan mejor en medios con reacción ácida. Crecen bien en medios con pH ajustado entre 3.5 y 3.8, en donde se inhiben casi todas las bacterias. El grado de tolerancia a los ácidos varía según la cepa y la especie, desde pH 2.2 a 8.0. Muchos medios de cultivo bacteriológicos usuales (variaciones de agar nutritivo y caldo nutritivo) son satisfactorios.

Tabla 2. Fermentación de azúcares por especie más conocida de levaduras.

Especie	Glucosa	Lactosa	Malobiosa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	+	-	+
<i>Saccharomyces fragilis</i>	+	+	-

7.2.4. *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae (Figura 4) es la principal especie utilizada por el hombre. Efectúa la fermentación alcohólica de la cual los productos terminales son alcohol etílico y gas carbónico (dióxido de carbono). La fermentación alcohólica se utiliza para fabricar el vino, la cerveza.

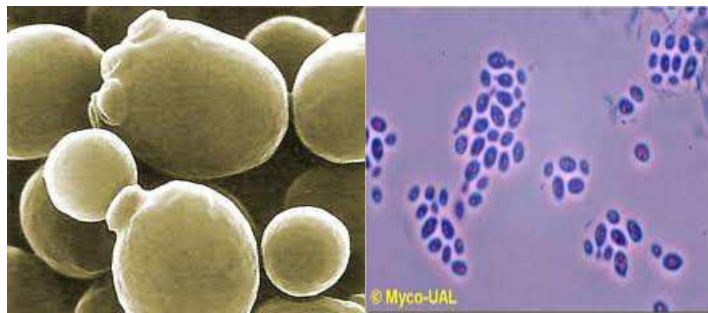


Figura 4. Microfotografía electrónica de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Se ha considerado que las levaduras son los microorganismos más vinculados al progreso y bienestar humano. Esto ha sido así principalmente por su capacidad de convertir eficientemente azúcares, como los que se encuentran en mostos de uva, frutas, cebada y otros cereales y leche en alcohol y CO₂.

Saccharomyces cerevisiae y algunas especies próximas han sido microorganismos muy utilizados tanto en microbiología industrial (bebidas fermentadas, pan y, ocasionalmente, glicerina y grasa) como en todo el desarrollo de la bioquímica. A esto último ha contribuido la facilidad de disponer de levaduras de pan o de cerveza prácticamente puras y en unas condiciones excepcionalmente favorables de mantenimiento y de cultivo.

7.2.4.1 Fermentación alcohólica

Es la transformación cuantitativa de la glucosa en etanol y CO₂. A parte de las levaduras, solamente se ha encontrado en *Zymomonas mobilis*, aunque este microorganismo sigue una ruta metabólica completamente distinta. En la figura 5 se presentan distintas etapas comprendidas en la fermentación alcohólica de la glucosa por la levadura.

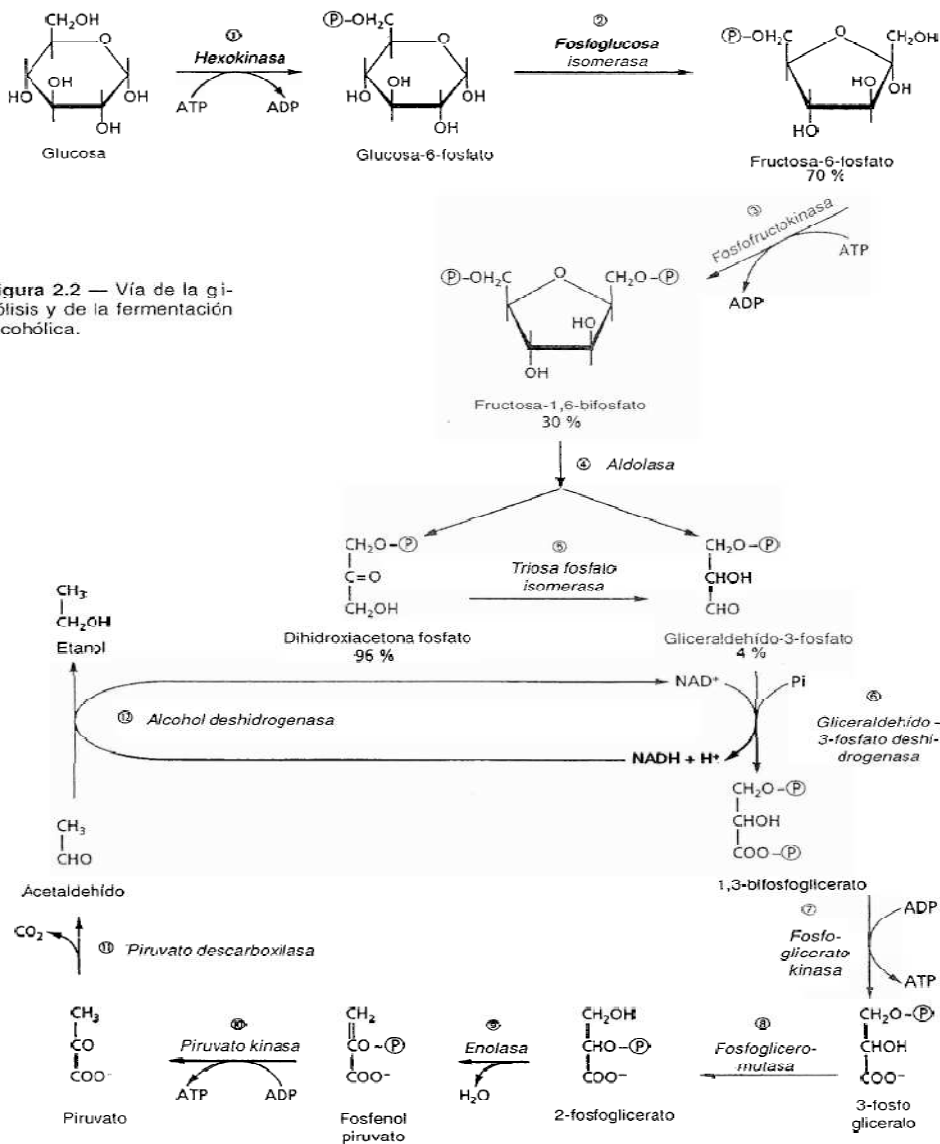


Figura 2.2 — Vía de la glicólisis y de la fermentación alcohólica.

Figura 5. Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura.

Desde la glucosa hasta la síntesis de piruvato, se trata de una vía metabólica idéntica a la glucólisis muscular, denominada vía de las triosas o de Embden-Meyerhof. La enzima característica de la vía de Embden-Meyerhof es la fosfofructoquinasa (Looder, 1970).

7.3. Generalidades del género *Zymomonas*

Shimwell (1937) aisló por primera vez *Zymomonas* a partir de cerveza. Este género, actualmente, se considera un contaminante serio en cervecería. Esta bacteria provoca una turbidez importante y un olor poco agradable a manzana podrida, debido a la presencia de acetaldehído y de hidrógeno sulfurado. Lidner, (1928) descubrió que la fermentación del aguamiel para la producción de la bebida alcohólica “pulque” que contiene del 4 al 6% de etanol era provocada por una bacteria que él denominó *Thermobacterium mobile* y que ahora se ha convertido en *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis*. En 1934, sugirió que esta bacteria prosperaba únicamente en las regiones tropicales.

Z. mobilis es una bacteria que durante la evolución se ha especializado para crecer en plantas de savia con alto contenido de azúcares, se presenta en forma de bastoncillo de 2 a 6 µm de longitud por 1 a 1.4 µm de ancho; generalmente en pares. La estructura es la típica de una Gram negativa. Las colonias obtenidas después de dos días de incubación a 30° C en medios estándares, son brillantes, blancas o crema y miden alrededor de 2mm de diámetro, su borde es regular. Es perceptible un olor afrutado cuya intensidad depende de la cepa. Crece en fructosa y glucosa y fermenta estos dos azúcares.

Inicialmente se postulaba que el mecanismo de utilización de glucosa y fructosa en *Zymomonas*, era igual al de las levaduras. Sin embargo en realidad *Zymomonas* no utiliza la vía glicolítica, sino la de Entner-Doudoroff (Figura 6) exclusivamente para la conversión de carbohidratos a piruvato y la posterior descarboxilación de éste por la enzima piruvato descarboxilasa para dar lugar a la

producción de etanol (Viikari, 1988) y de acuerdo al balance energético de esta vía sólo se produce una mol de ATP por mol de glucosa utilizado.

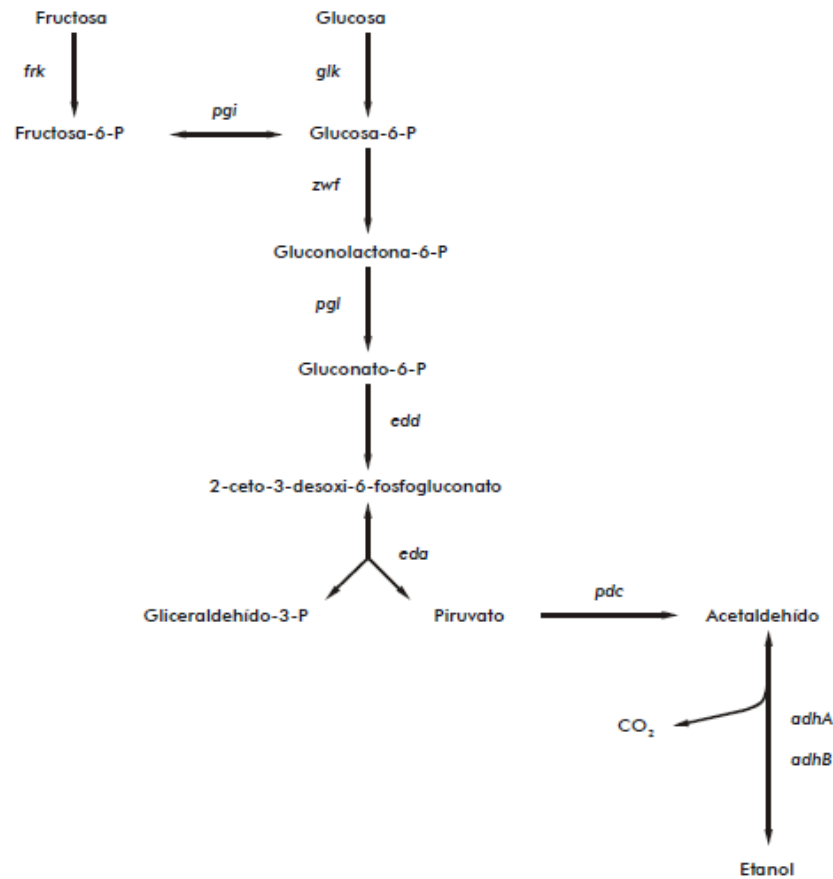


Figura 6. Vía lineal de Entner-Doudoroff en *Z. mobilis*. Abreviaturas: *frk*, fructocinasa; *pgi*, glucosa-6-fosfato isomerasa; *glk*, glucocinasa; *zwf*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*, 6-fosfogluconolactonasa; *pdc*, piruvato descarboxilasa; *adhA*, alcohol deshidrogenasa I, *adhB*, alcohol deshidrogenasa II.

Las cepas no forman cápsulas, son oxidasa negativa y no producen indol. No reducen los nitritos, el rojo neutro, el tween 60 u 80. No forman esporas; presentan una movilidad debida a 1-4 flagelos lofótricos (si hay presencia); no presenta crecimiento en medio (caldo o agar) nutritivo y es un organismo anaerobio, pero tolera bajas cantidades de oxígeno (Leveau, 2000).

Este género, no es una bacteria estrictamente anaerobia. La aireación disminuye el rendimiento en etanol y la concentración de ácido láctico, aumenta la concentración de consumo específico de la glucosa y la producción de ácido acético. La inhibición es más importante sobre el etanol que sobre el crecimiento celular. Entre las bacterias, *Z. mobilis* es la especie que presenta probablemente la tolerancia más elevada al etanol. Es capaz de la producción de etanol con concentraciones superiores al 13% (Leveau, 2000).

Con respecto a los productos de inhibición se podría decir que *Z. mobilis* produce etanol y dióxido de carbono. Aunque la teoría más común es la de inhibición por etanol, se ha reportado el crecimiento de *Z. mobilis* en placas con agar y etanol al 15% (v/v), en fermentadores se ha observado que la pérdida de la viabilidad empieza a partir de una concentración de etanol de 13% o del 16% (v/v) (Rogers *et al.*, 1982; Supanwong *et al.*, 1983).

Se ha afirmado que para *Z. mobilis* el efecto pasteur está ausente (Belaich y Senez, 1965); razón por la cual se considera que el producto de inhibición no es el etanol sino el dióxido de carbono (CO₂). *Z. mobilis* cuenta con una membrana celular de composición única (Timoshin *et al.*, 1989), lo cual impide que el etanol se acumule dentro de la célula (DeFranca y Leite, 1989). En una fermentación la mayor cantidad de CO₂ producido se encuentra disuelto en el caldo de cultivo, la solubilidad del CO₂ en el medio acuoso depende de la concentración de especies iónicas y no polares, como el etanol.

El pH también es un factor del cual depende la producción de etanol, un pH de 6.5 es óptimo para el crecimiento de las células de *Z. mobilis* mientras que un pH de 4.0 es óptimo para la producción de etanol (Jones y Doelle, 1991).

7.4. Generalidades de las bacterias Lácticas (BAL)

El ácido láctico es consecuencia del desarrollo de una tipo peculiar de microorganismos englobados en un grupo denominado bacterias del ácido láctico.

Las bacterias del ácido láctico intervienen en la preparación de mucho alimentos, como la col ácida (“sauerkraut”), los embutidos curados, pepinillos y análogos y las aceitunas aliñadas. También son esenciales para la leche ácida, el kéfir, el yogur y los forrajes ensilados. Forman parte del proceso de fabricación de muchos quesos, solas o en conjunción con hongos y propionibacterias. Hay bacterias del ácido láctico que son patógenas.

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico, lo cual da lugar a actividad óptica. Hay dos estereoisómero el D (-) y el L (+), además del racémico, ópticamente inactivo. Esta es una de las características taxonómica importante, puesto que cada especie produce un tipo de ácido láctico.

La estequiometría clásica de la fermentación láctica es:



Este proceso tiene lugar también en el músculo (glucólisis anaerobia).

Las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista taxonómico. Tienen como característica común la de producir ácido láctico como catabolito único o mayoritario en la fermentación de los azúcares. Los miembros más característicos son cocos o bacilos grampositivos, inmóviles y catalasa negativos.

Los cocos Gram positivos se distribuyen en tres grupos: aerobios, facultativos y anaerobios. Los primeros se distinguen por una prueba de oxidación/fermentación, como la de Hugh y Leifson, que da +/-, a diferencia de los facultativos que dan +/+. Los anaerobios sólo se desarrollan en anaerobiosis estricta. Sin embargo, dentro de los facultativos debemos distinguir aquellos que tienen la capacidad de alternar un metabolismo oxidativo aerobio con otro fermentativo, de aquellos otros que nunca pueden utilizar el O₂ como aceptor final

de electrones, pero que fermentan indistintamente en presencia y en ausencia de aire. Este último caso es el de las lácticas incluidas dentro del grupo de cocos Gram positivos facultativos.

Algunos cocos del grupo láctico crecen mal en condiciones estrictamente anaerobias, aunque nunca utilizan el O₂. Otros crecen solo a bajas presiones parciales de oxígeno y por ello se les denomina microaerófilos. Finalmente, muchas bacterias lácticas crecen mejor en una atmósfera que contenga del 5 al 10% de CO₂ y algunas no crecen sin este requisito.

Otra característica de las bacterias del ácido láctico, que abarca tanto cocos como a bacilos, es la de presentar unos requerimientos nutritivos complejos. Esto lleva a la necesidad de utilizar medios especiales como el de agar sangre, el de Edwards, el de jugo de tomate o el de rogosa. Las características comunes de todos estos medios son la presencia de azúcar, la adición de productos naturales complejos apropiados a cada caso y, para el aislamiento, la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento de otros microorganismos. Es esencial tener en cuenta que en las bacterias lácticas el azúcar se utiliza sólo como fuente de energía, en tanto que el carbono para el crecimiento se toma de aminoácidos.

El ácido láctico puede ser también producido en mayor o menor proporción por bacterias que no suelen incluirse en el grupo láctico. Además de los bacilos Gram positivos no esporógenos, podemos añadir *Bifidobacterium*, y algunas especies de *Bacillus*, *Clostridium perfringens*, *Butyribacterium rettgeri*, especies de *Microbacterium* y muchas bacterias entéricas.

Desde el punto de vista bioquímico, la clasificación fundamental de las verdaderas bacterias del ácido láctico, de acuerdo con lo que establecieron Kluver y Donker, es la de la homofermentativas que sólo producen ácido láctico a partir de la glucosa y las heterofermentativas que producen otros catabolitos entre los que siempre se encuentra el CO₂. El carácter gasogénico de la fermentación de la glucosa es muy fácil de poner de manifiesto y, juntamente con la morfología y

otras pocas características, permite determinar cada uno de los géneros en los que podemos distribuir las bacterias del ácido láctico (Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades distintivas de los cinco géneros de bacterias del ácido láctico.

Forma	Fermentación	Catalasa	Género
Cocos en cadenas o en parejas	Homoláctica	-	<i>Streptococcus</i>
Cocos en cadenas o en parejas	Heteroláctica	-	<i>Leuconostoc</i>
Cocos en tétradas	Homoláctica (D,L-láctico)	-	<i>Pediococcus</i>
Cocos en tétradas	Heteroláctica (D -láctico)	± (pseudocatalasa si la reacción es positiva)	<i>Aerococcus*</i>
Bacilos usualmente en cadenas	Homo o Heterolácticos	-	<i>Lactobacillus</i>

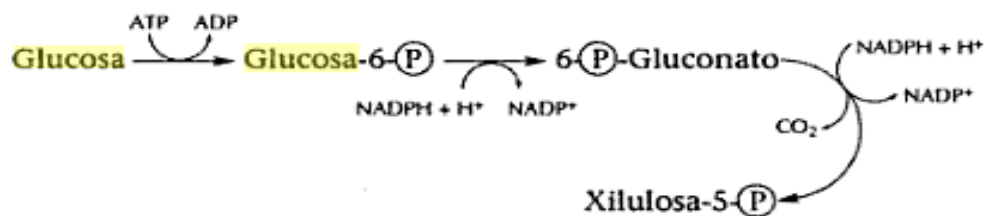
Fermentaciones lácticas de Hexosas y Pentosas

Existen bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras utilizan las hexosas siguiendo la vía de Embden-Meyerhof. Sin embargo, hay homofermentativas obligadas y facultativas. Estas últimas tienen glucosa-6-P-deshidrogenasa y siguen la vía de la pentosa. El que utilicen una vía y otra, alternativa o simultáneamente, depende de las condiciones del cultivo.

Las bacterias lácticas heterofermentativas propiamente dichas producen siempre, además de ácido láctico, otros productos de finales de la fermentación heteroláctica.

La formación del ácido láctico siempre tiene lugar por reducción del ácido pirúvico, mediante la deshidrogenasa láctica. Se conocen varios tipos de enzima según el estereoisómero producido y según sean dependientes del $\text{NADH} + \text{H}^+$ o del FADH_2 .

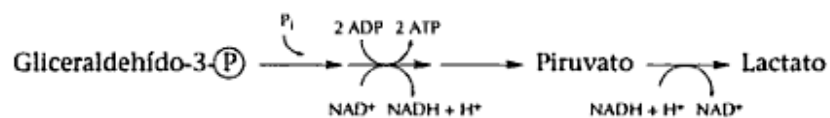
La fermentación homoláctica de la glucosa es una conversión de un mol de azúcar en dos de ácido láctico. En la fermentación heteroláctica tenemos una formación de Xilulosa-5-fosfato (X-5-P) por el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa:



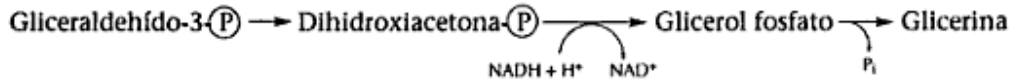
La X-5-P es el intermediario clave de la llamada vía de la pentosa, paralelamente a las denominaciones frecuentemente utilizadas de las vías de la hexosa monofosfato (Warburg-Dickens o vía de la pentosa fosfato) y de la hexosa difosfato (Embden-Meyerhof o de las triosas). La enzima característica es la de fosfopentosa fosfocetolasa:



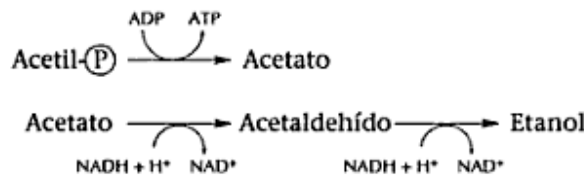
El gliceraldehído-3-P (GA-3-P) es transformado en lactato por la vía de Embden-Meyerhof:



La fosfotriosa isomerasa puede dar origen a glicerina como sistema de reoxidación de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$, según ya ha sido comentado:



El acetil-P puede dar origen a acetato y a etanol.



En la fermentación láctica de las pentosas se hace innecesario el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y no se produce CO_2 :

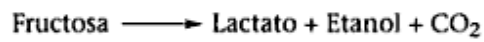


El único NAD^+ que se reduce en la oxidación del fosfogliceraldehído se reoxida en la formación de lactato.

Bifidobacterium puede transformar una molécula de glucosa en tres de acetato, pero normalmente se forman tres moles de acetato y dos de lactato por cada dos moles de glucosa. Por esta razón, los miembros del género de *Bifidobacterium*, además de la pentosafosfocetolasa es una característica una hexosa fosfocetolasa.

Fermentaciones lácticas de la fructosa

Lactobacillus plantarum, que es homofermentativo facultativo, fermenta la fructosa siguiendo el modelo heterofermentativo:



En cambio, *Lactobacillus brevis*, que es heterofermentativo obligado, produce una fermentación como se muestra en la figura 7 del mismo azúcar de acuerdo con la siguiente estequiometría:

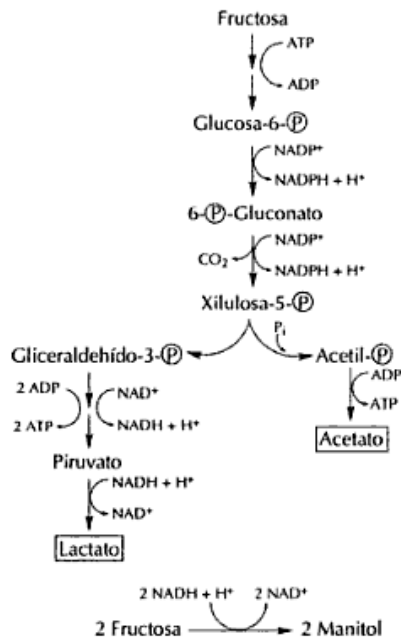
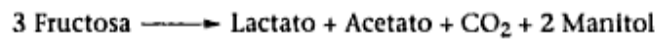


Figura 7. Esquema de fermentación *Lactobacillus brevis*

7.5. Generalidades de las bacterias Acéticas (BAA)

Llaguno y Polo (1991), dan una definición del vinagre, en la cual se dice que deriva del Francés “vin aigre” (vino agrio), por lo que el precedente del vino merece ese nombre. Por extensión, se denominan vinagres a los productos resultantes de la fermentación acética de diversos sustratos alcohólicos, añadiendo al nombre vinagre el del sustrato correspondiente, como “vinagre de sidra”.

El vinagre es producido por dos fermentaciones, la primera corresponde a la conversión de azúcares fermentables a etanol por levaduras, del género *Saccharomyces* principalmente. La segunda fermentación se desarrolla a partir de la oxidación de etanol por bacterias, del género *Acetobacter* (Tesfaye *et al.*, 2002).

Hansen (1878) fue el primero en demostrar que la transformación del etanol en ácido acético la realizan unas bacterias particulares de las cuales hay varios tipos y que en conjunto se denominan “bacterias del ácido acético”. Hansen obtuvo el cultivo puro de varias de ellas. Realizó la fermentación acética del etanol con cultivos puros y mixtos y puso claramente de manifiesto la necesidad de oxígeno, la que ponía en entredicho el concepto de “fermentación acética”, puesto que en rigor el término “fermentación” es sólo aplicable a anaerobios.

Según diversos autores las bacterias acéticas se clasifican en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley, 1984 citado por Lu, 1999; Deppenmeier, 2002 y Du Toit y Lambrechets, 2002). Esta clasificación se basa en la habilidad de sobre oxidar el acetato y el lactato y la posición de flagelos, puesto que *Acetobacter* prefiere oxidar el etanol más que glucosa y *Gluconobacter* prefiere oxidar glucosa más que al etanol. El tipo de bacteria utilizada en la industria del vinagre mayoritariamente es *Acetobacter*, sin embargo el género *Gluconobacter*, perteneciente al grupo de las bacterias acéticas es usado en aplicaciones industriales.

La descripción del género *Acetobacter* señala a las células que van de la forma elipsoidal recta o ligeramente curvada, encontrándose aisladas, en parejas o en cadenas. Son frecuentes las formas de involución de algunas especies: esféricas, alargadas, hinchadas, curvadas y filamentosas. Móviles o no móviles, si son móviles los flagelos son peritricos o laterales. No forman endosporas. Gram negativas y en algunos casos Gram variables (De Ley *et al.*, 1984).

Son aerobias estrictas, por lo que tienen un metabolismo respiratorio en que el oxígeno es el aceptor final de electrones. Forman colonias pálidas. Catalasa positiva, oxidasa negativa. No licuan la gelatina y no forman indol o H₂S. Oxidan el etanol a ácido acético y el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O. El pH óptimo para su crecimiento es de 5.4 a 6.3. *Acetobacter* se encuentra en flores, frutas, vino de uva, sidra, cerveza, vinagre, virutas de madera de generadores de vinagre y acetificadores, entre otros (De Ley *et al.*, 1984).

De Ley *et al.* (1984) y Deppenmeier (2002) describen al género *Gluconobacter* con las mismas características del género *Acetobacter*, sólo que *Gluconobacter* es caracterizado por su incompleta oxidación en un amplio rango de carbohidratos y alcoholes. Se diferencia de *Acetobacter* ya que no es capaz de oxidar el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O. Existen cuatro especies pertenecientes al género *Gluconobacter*, estas son *G. asaii*, *cerinus*, *frateurii* y *oxidans*, las cuales crecen en medios que presentan altas concentraciones de azúcares y otra característica es que produce una baja cantidad de biomasa. Estos organismos son capaces de crecer a altas concentraciones de azúcar y a pH bajo. Su alta tasa de oxidación correlacionado con su baja producción de biomasa, hace de *Gluconobacter* un organismo de interés por sus aplicaciones industriales, con modernos procesos fermentativos como la producción de L-sorbosa (síntesis de vitamina C) y 6-amino-L-sorbosa (producción de droga antidiabética) los que son llevados a cabo por miembros de este género. Los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, según tengan o no capacidad de oxidar el acetato (presencia del ciclo de Krebs

funcional). Pueden considerarse filogenéticamente próximas al grupo *Pseudomonas* (Tabla 4).

Tabla 4. Características diferenciales de los géneros *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*

Características	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Flagelación	Polar o ninguna	Peritrica o ninguna	Polar
Crecimiento a pH 4,5	+	+	-
Oxidación de:			
Etanol a ácido acético a pH 4,5	+(M)	+(F)	-
Ácido acético a CO ₂	-	+	d
Lactato a CO ₂	-	+	+
Glucosa a gluconato	+	d	d
Aminoácidos por células en reposo	-	+	+
Ciclo de Krebs	-	+	+
Producción de 5-cetogluconato	+	d	-
Cetogénesis	+	d	-
Quinonas Q ₁₀	+	-	
Quinonas Q ₉	-	+	
Hidrólisis de:			
Lactosa y almidón	-	-	d
Gelatina	-/D	-	d
Pigmentos verdosos y/o fluorescentes	-	-	d

* M, moderado; F, fuerte; D, débil; d, variable según la cepa.

Las bacterias del ácido acético pueden aislarse fácilmente del vinagre y también del vino, la cerveza o los zumos de frutas agriados. Para su aislamiento, basta con centrifugar un volumen de uno de estos medios, resuspender el sedimento en Ringer ¼ y sembrar diluciones sucesivas de la suspensión en placas de agar que contengan 0.05% de triptona, 2% de glucosa, 1% de CaCO₃ y 20% de extracto de carne. Después de una incubación a 30 °C durante 2 o 3 días, las colonias que forman las bacterias del ácido acético pueden reconocerse porque clarifican el medio a su alrededor (disolución de la dispersión de CaCO₃) formando un halo.

La fermentación acética puede ser definida como un proceso bioquímico, por el cual las bacterias acéticas oxidan al etanol contenido en el sustrato alcohólico a ácido acético, bajo estrictas condiciones de aerobiosis. Las condiciones óptimas de fermentación se refieren a la ventaja de conocer la información acerca de la cinética de crecimiento bacteriano y de los procesos automatizados de fermentación (Llaguno y Polo, 1991).

Para que la fermentación acética ocurra se deben cumplir una serie de requisitos que incluyen el suministro de oxígeno, la temperatura óptima y las características de la materia prima.

Según Llaguno y Polo (1991) el sustrato alcohólico debe estar libre de sabores y olores extraños, limpio, sin restos de azúcares fermentables que puedan provocar contaminaciones posteriores con levaduras. En cuanto a su graduación alcohólica, se ha venido considerando que los vinos utilizados en el proceso de acidificación deben ser de baja graduación, aunque se permite utilizar vinos con una graduación alcohólica de 10 a 12 % v/v.

En cuanto a la concentración de etanol, Gómez citado por De Ory *et al.* (2002) plantea la influencia de la concentración de etanol sobre la fermentación acética y entrega una concentración óptima de 13 g/L. Aunque este valor depende de la concentración de otros compuestos tóxicos como ácido acético.

Otro factor que influye sobre la fermentación acética es la concentración de ácido acético. Bar citado por De Ory *et al.* (2002) afirma que el ácido acético tiene un carácter de activador y a la vez de inhibidor, sobre la actividad del microorganismo *Acetobacter aceti*, por lo que han propuesto un efecto de activación sobre el crecimiento del microorganismo cercano a 10 g/L para el metabolismo bacteriano.

La figura 8 muestra los rangos óptimos de las concentraciones de etanol y ácido acético y su influencia sobre el crecimiento bacteriano.

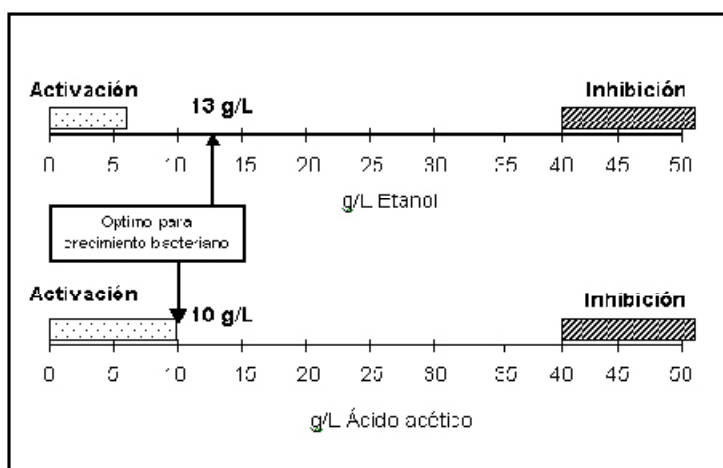


Figura 8. Influencia de la concentración de etanol y ácido acético sobre el crecimiento bacteriano de *Acetobacter aceti*.

Influencia de la temperatura

La temperatura del medio influye sobre el crecimiento de microorganismo. Llaguno y Polo (1991), De Ory *et al.* (1998b) y De Ory *et al.* (2004) proponen una temperatura óptima de fermentación acética comprendida dentro del rango de 30 a 31° C; de esta forma, el proceso de fermentación es viable entre los 28 y 33° C. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a 33° C o está por sobre la temperatura óptima, ocurre un proceso de desactivación bacteriana, en el cual las enzimas son desnaturalizadas, la membrana dañada, causando que los constituyentes se dispersen y el organismo sea más sensible a los efectos tóxicos de la célula, además de aumentar las pérdidas de alcohol y productos volátiles.

Influencia de la aireación

El factor aireación, se considera fundamental, dado que las bacterias acéticas requieren de un suministro constante de oxígeno, además de una agitación orbital para homogeneizar el contenido y garantizar la aireación. La concentración de oxígeno disuelto en el medio se debe mantener constante, en torno a 2 mg/L y la cantidad de aire suministrado debe ser aproximadamente de 50 mL/min para 100 mL de medio lo que equivale a 0.5 vvm que es el volumen de aire introducido, por unidad de volumen de fermentador por minuto.

La incorporación de aire es un proceso esencial, dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas. Además de la cantidad de aire suministrado, se debe considerar la pureza y calidad de éste, las bacterias acéticas son sensibles a contaminantes presentes en el aire (Llaguno y Polo, 1991).

No obstante, algunos autores mencionan que el proceso de fermentación acética es estrictamente dependiente sobre el oxígeno abastecido a la fase líquida y se requiere de un sistema de distribución gas líquido para la transferencia de

oxígeno, ya que afecta directamente sobre la productividad del proceso de fermentación (Fregapane *et al.*, 1999).

Oxidación del etanol

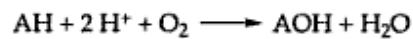
La oxidación del etanol por las bacterias del ácido acético tiene lugar en dos etapas, llevando la primera de ellas a la producción de acetaldehído y la segunda a acetato:



La reacción global de la fermentación acética



Es una oxidación sin producción de CO₂ por lo que aparentemente correspondería a una asimilación de oxígeno por una reacción mono-oxigenásica.



En realidad se trata de dos reacciones des-hidrogenásicas en las cuales los 4h van a formar H₂O con O₂ por una cadena respiratoria que comprende la citocromo oxidasa. Una de las dos moléculas de agua es requerida para la oxidación del acetaldehído.

Las especies del género *Gluconobacter* no tienen ciclo del ácido cítrico funcional y acumulan acetato. Las del género *Acetobacter* sólo acumulan acetato mientras

hay alcohol en el medio, pero luego pueden oxidar el acetato hasta CO_2 . En el género *Pseudomonas* la oxidación del acetato tiene lugar simultáneamente con la del etanol. La capacidad de oxidar el acetato no es uniforme en todos los miembros del género *Acetobacter*.

En los miembros del género *Gluconobacter*, tanto la oxidación del etanol como la del acetaldehído están ligadas directamente a la citocromo c_{553} y tienen un pH óptimo entre 5.7 y 6.2.

Esto sugiere que en las bacterias del ácido acético el transporte de hidrógeno desde el etanol y el acetaldehído puede depender de enzimas diferentes. En términos generales la oxidación del etanol en *Gluconobacter* y *Acetobacter* puede representarse como se indica en la figura 9.

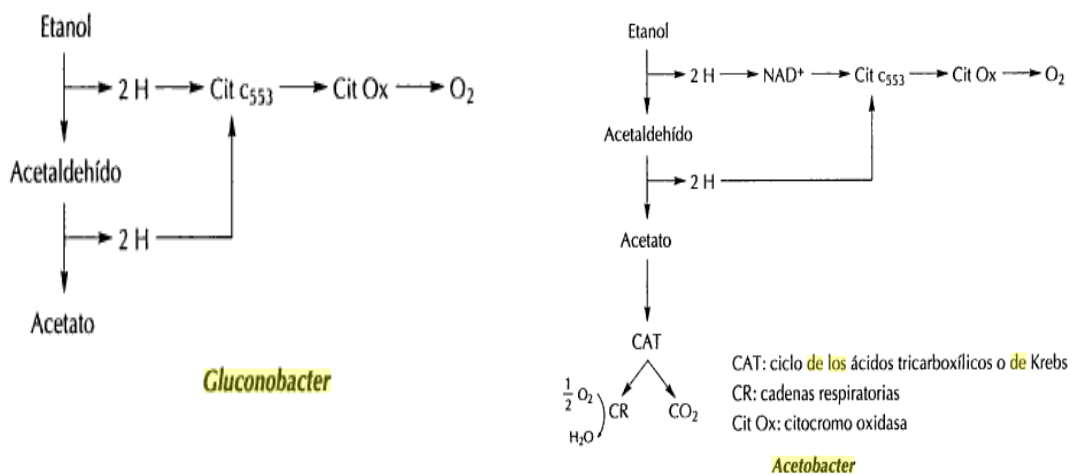


Figura 9. Oxidación del etanol en *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Nótese que *Gluconobacter* no requiere de NAD^+

En *Acetobacter*, el alcohol deshidrogenasa moviliza todo el NAD⁺ mientras haya alcohol disponible. El ciclo de Krebs se paraliza al no disponer del NAD⁺ (Asai, 1868).

7.6. Obtención de bebidas fermentadas

El etanol puede ser producido a partir de cualquier sustrato biológico que contenga cantidades apreciables de azúcares o materiales como el almidón y celulosa que puedan ser convertidos en éstos (Rutz y Janssen, 2007).

Las variedades de materias primas utilizadas para la producción de etanol vía fermentación son, convencionalmente clasificados en tres tipos de materia: azúcares, almidones y celulosa. Los azúcares (azúcar de caña, remolacha de azúcar, melazas y frutas) pueden ser convertidos a etanol directamente (Lin y Tanaka, 2006).

Ratnam *et al.* (2007) aplicaron un diseño experimental Plackett-Burman y un diseño compuesto central para optimizar la producción de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* empleando como sustrato azúcar de savia de palma (*B. flabellifer*) en un fermentador por lote.

El maíz, el trigo, la cebada, el centeno y otros cereales son típicos sustratos que contienen almidón en sus granos, el cual puede ser fácilmente convertido a azúcares por medio de un tratamiento previo y posteriormente a etanol. En USA y Europa el etanol es producido principalmente de maíz y granos. También se pueden emplear otros sustratos que contiene almidón para la producción de etanol como granos de sorgo, yuca y papa (Rutz y Janssen, 2007).

Existe una gran cantidad de celulosa y hemicelulosa disponible para la producción de etanol; estos carbohidratos complejos pueden ser convertidos a azúcares aunque con una mayor dificultad que la conversión del almidón. Dentro de la biomasa celulósica se encuentran diferentes tipos de residuos: agrícolas, forestales, sólidos municipales y de papel (Rutz y Janssen, 2007).

7.6.1. Efecto del pH y temperatura

La variación en la producción de etanol se puede deber a que los microorganismos sean de especies o variedades diferentes, lo que exige diferentes condiciones fisicoquímicas óptimas como temperatura o pH para cada cepa en particular (Lin y Tanaka, 2006).

7.6.2. Efecto de la composición del medio de cultivo.

Las levaduras pierden viabilidad debido a la fuerte inhibición por el etanol, por tal razón el mejoramiento sobre la tolerancia de este alcohol es un prerrequisito para la fermentación a altas concentraciones. Hasta ahora diferentes estrategias han sido desarrolladas para solucionar este problema, incluyendo el desarrollo de cepas tolerantes al etanol por medio de ingeniería genética (Alper *et al.*, 2006), así como procesos de optimización (Alfenore *et al.*, 2004), suplementación de iones metálicos que han sido reportados como efectivos (Nabais *et al.*, 1988; Hu *et al.*, 2003 a,b).

El magnesio y el calcio son dos iones metálicos bien estudiados que ejercen un efecto significativo sobre la viabilidad celular y producción de etanol (Dombek e Ingram, 1986; Nabais *et al.*, 1988).

Jones *et al.* (1981) han listado varios cationes que pueden ser utilizados como suplementos y sus efectos estimulantes sobre la fisiología del microorganismo fermentativo. El fierro, zinc y manganeso son requeridos como cofactores para varias rutas metabólicas (Morris, 1958). El magnesio influye en el consumo de glucosa por los microorganismos así como su crecimiento por regulación del ciclo celular (Graeme y John, 1980; Dombek e Ingram, 1986). El potasio, cobalto y magnesio son considerados como cofactores para la glucólisis (Crane, 1975), mientras que el cobre, zinc y manganeso son reportados por influenciar la biomasa de levaduras por la activación de fosfatasa, incrementando la síntesis de aminoácidos y de ácidos grasos (Vesna *et al.*, 2004), lo cual contribuye al rendimiento del producto. El sodio incrementa el consumo de glucosa favoreciendo la producción de etanol (Jones y Greenfield, 1981).

7.7 Evaluación sensorial

Conjunto de técnicas de medida y evaluación de determinadas propiedades de los alimentos por uno o más de los sentidos humanos. Mediante esta evaluación pueden clasificarse las materias primas y productos terminados, conocer qué opina el consumidor sobre un determinado alimento, su aceptación o rechazo, así como su nivel de agrado, criterios estos que se tienen en cuenta en la formulación y desarrollo de los mismos (Espinosa, 2007).

Los compuestos volátiles, pueden ser detectados en partes por billón (ppb) y son percibidos por los nervios olfatorios al final de la nariz. Los volátiles más livianos son los primeros en ser captados y generalmente tienen mayor impacto en la percepción humana. Algunos aromas corresponden a la combinación de varios compuestos, mientras que otras pueden producir enmascaramiento (Moya *et al.*, 2004).

La evaluación sensorial está dada por la integración de los valores particulares de cada uno de los atributos sensoriales de un alimento, por tanto no debe absolutizarse que una propiedad en particular es la que define la calidad de un producto dado; sino que existe una interrelación entre ellas, que no permite por tanto menospreciar el papel de ninguno de estas. Las características organolépticas de los alimentos, constituyen el conjunto de estímulos que interactúan con los receptores del analizador (órganos de los sentidos). El receptor transforma la energía que actúa sobre él, en un proceso nervioso que se transmite a través de los nervios aferentes o centrípetos, hasta los sectores corticales del cerebro, donde se producen las diferentes sensaciones: color, forma, tamaño, aroma, textura y sabor. La percepción es la respuesta ante las características organolépticas, es el reflejo de la realidad, que pudiera ser más o menos objetiva, en función de la aplicación o no de técnicas correctas de evaluación del mecanismo de percepción sensorial (Figura 10) (Espinosa, 2007).

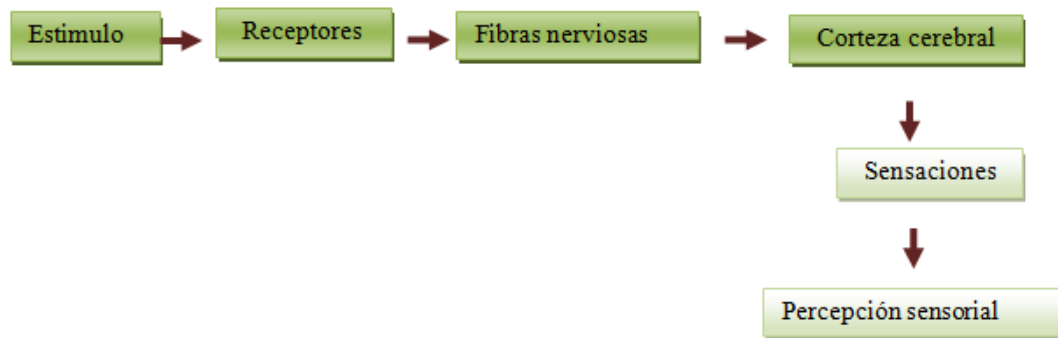


Figura 10. Mecanismo de recepción sensorial.

Los sentidos son los medios con los que el ser humano percibe y detecta el mundo que lo rodea. El ser humano tiene cinco sentidos: la vista, el oído, el olfato, el gusto y el tacto. Todos ellos tienen gran importancia para el hombre y cuando falta alguno de ellos, su vida se ve afectada e, incluso, puede llegar a estar en peligro (Espinosa, 2007).

La vista

La visión se realiza a través de los ojos, que se ubican en las cavidades orbitarias de la cara. Cuentan con unas células fotorreceptoras, es decir, sensibles a la luz, que al ser estimuladas por ésta mandan impulsos al cerebro para que los interprete.

A través de este sentido se percibe las propiedades sensoriales externas de los productos alimenticios como lo es principalmente el color, aunque también se perciben otros atributos como la apariencia, la forma, la superficie, el tamaño, el brillo, la uniformidad y la textura. Un defecto visual importante es el daltonismo, que consiste en la incapacidad de detectar ciertos colores, o la confusión de un color por otro (Ackerman, 1990).

El olfato

El olor de los alimentos se origina por las sustancias volátiles que cuando se desprenden de ellos pasan por las ventanas de la nariz y son percibidos por los receptores olfatorios. Los seres humanos disponen de unos 1,000 receptores conocidos que parece ser que distinguen unos 10,000 olores distintos, sin embargo, a veces el mecanismo olfatorio no funciona adecuadamente y se produce una significativa pérdida de la capacidad olfativa o ausencia total de la facultad de oler, debido a varios factores como son: edad, infecciones virales, alergias, consumo de ciertos fármacos, entre otros. Dicha anomalía se conoce con el nombre de anosmia. El sentido del olfato funciona mediante todo el sistema nasal. En el interior de la nariz y de la zona facial cercana a esta, existen regiones cavernosas cubiertas de una mucosa pituitaria, la cual presenta células y terminales nerviosos que reconocen los diversos olores y transmiten a través del nervio olfativo hasta el cerebro la sensación olfatoria. Un aspecto importante que señala la literatura hoy en día es la diferencia existente entre olor y aroma, pues el primero es la percepción de las sustancias volátiles por medio de la nariz, en cambio el aroma es la detección que se origina después de haberse puesto en contacto el alimento en la boca, o sea que el aire en el caso del aroma no es el medio de transmisión de la sustancia, sino la membrana mucosa del paladar (Espinosa, 2007).

Algunas personas no pueden percibir olores, y esta condición es conocida como anosmia. Puede ser un defecto temporal como en el caso de la gripe o temporalmente, lo cual es muy raro (Ackerman, 1990).

El gusto

La lengua que es un órgano musculoso que además de su función gustativa, participa en la deglución y articulación de las palabras. Toda su superficie a excepción de la base, está recubierta por una mucosa, en cuya cara superior se encuentran las papilas, los receptores químicos de los estímulos gustativos.

Las papilas se clasifican según su forma. Sólo las caliciformes, que se disponen en V, y las fungiformes, que se sitúan en la punta, los bordes y el dorso de la lengua, son las que tienen una auténtica función gustativa, ya que son las únicas que poseen botones o corpúsculos gustativos. Las papilas filiformes y coroliformes actúan por el tacto y por su sensibilidad a los cambios de temperatura. Las papilas recogen cuatro sabores fundamentales: dulce, salado, ácido y amargo, cuya proporción e intensidad sirven al cerebro para reconocer el alimento al que corresponden.

Para que una sustancia pueda estimular las células sensitivas de los botones gustativos, debe ser un líquido o bien una sustancia soluble en saliva con el fin de que pueda penetrar por el poro gustativo.

Los botones gustativos no se reparten de forma uniforme por toda la superficie de la lengua, sino que se distribuyen originando zonas de mayor o menor concentración. Estas determinadas zonas sensibles se especializan en un sabor concreto así, los botones sensibles al sabor dulce se localizan principalmente en la superficie anterior de la lengua; los que captan la acidez, a ambos lados de esta; los botones sensibles a lo amargo, en su superficie posterior; y los sensibles a lo salado se esparcen por toda la lengua.

El sentido del gusto hace referencia a los sabores en los alimentos. Este atributo hace referencia a la combinación de tres propiedades: olor, aroma y gusto. Cuando un individuo o catador se encuentra resfriado no puede percibir olores ni sabores, es por esto que cuando se realice una evaluación sensorial de sabor, no sólo se debe tener en cuenta que la lengua del panelista este en perfectas condiciones sino además que no tenga problemas con la nariz y con la garganta (Ackerman, 1990).

Tacto

El sentido del tacto está localizado en las terminaciones nerviosas que están situadas justo debajo de la piel de todo el cuerpo. Puede decirse que el sentido del tacto está en todo el cuerpo, excepto en las uñas, el pelo y la córnea del ojo.

Son especialmente importantes, en el caso de la evaluación sensorial de los alimentos, las percepciones táctiles por medio de los dedos, la palma de la mano, la lengua, las encías, la parte interior de las mejillas, la garganta, y el paladar, ya que es donde se detectan los atributos de la textura de los alimentos.

El tacto sirve para percibir una variedad de sensaciones tales como la temperatura del medio y de los objetos, el peso de éstos, las características de su superficie y, como ya se mencionó, la textura de los alimentos. La pérdida del sentido del tacto, por lo general, no es total dada su extensa distribución de todo el cuerpo, sino localizada en algunas partes tales como las extremidades, y generalmente se debe a lesiones de la espina dorsal como consecuencia de enfermedades o accidentes (Ackerman, 1990).

El oído

El oído es el sentido mediante el cual captamos los sonidos, que son el resultado de las vibraciones del aire originadas por las cuerdas vocales, los labios y la lengua de las personas al hablar, o por los objetos al caerse, romperse, tallarse, rasparse, rasgarse, etc. Estas vibraciones son transmitidas hacia las orejas, y luego amplificadas por el tímpano y los huesecillos del oído medio y por el oído interno, y detectadas por el cerebro.

El sentido del oído participa en la detección de la textura de los alimentos. El sonido no solo se transmite por el aire, si no que las vibraciones pueden ser conducidas por los huesos, y estos sucede con los sonidos de masticación de los alimentos, los cuales suelen ser tomados en cuenta en la evaluación de la textura.

La interpretación de las sensaciones que son enviadas al cerebro por los cinco sentidos se lleva a cabo en dicho órgano (Ackerman, 1990).

7.8. Jueces

Los “instrumentos” principales para efectuar la evaluación sensorial son los órganos sensores y la capacidad integradora de los jueces. Se llama juez al individuo que está dispuesto a participar en una prueba para evaluar un producto valiéndose de la capacidad perceptiva de uno o varios de sus sentidos. Se distinguen dos tipos de jueces:

- I. Analítico u objetivo, para evaluar deferencias, intensidades y calidades de muestras.
- II. Afectivo o consumidor, para evaluar aceptación, preferencia o nivel de agrado (Anzaldúa Morales, 1988).

Entrenamiento de jueces

Los panelistas que acepten integrar los paneles entrenados deberán someterse a pruebas, para determinar si tienen agudeza sensorial normal. Esto puede realizarse al pedirles que en una prueba identifiquen sabores básicos y olores comunes. Deberá también evaluarse la sensibilidad de los panelistas, es decir su capacidad para discriminar diferentes grados de una característica sensorial específica. Para determinar la capacidad de discriminación de los panelistas, a menudo se emplean pruebas triangulares de degustación, utilizando muestras de alimentos o soluciones idénticas excepto en lo que respecta a una característica de sabor o textura. Las personas que tengan un pobre sentido de olfato o gusto, o que no tengan sensibilidad a diferencias en intensidad de sabor y textura, podrán ser identificadas a través de este proceso. Este proceso de selección inicial, provee de una experiencia sensorial preliminar a aquellos candidatos seleccionados para integrar el panel entrenado definitivo (Cross *et al.*, 1978)

Una vez concluida la selección inicial, los panelistas deberán probar su habilidad para discriminar utilizando muestras muy similares o idénticas, de entre aquellas

que se estudiarán en las pruebas. La capacidad de discriminación de algunos panelistas es excelente para un tipo de alimento, pero no para otros; por ello, es importante encontrar panelistas que sean sensibles a las diferencias en el alimento objeto de estudio (Anzaldúa-Morales, 1988).

El entrenamiento del panel toma aproximadamente 1 hora diaria, por lo general de 2 a 4 veces por semana, se recomienda como horarios adecuados entre las 11 am y 1 pm y de 5 pm a 6 pm (Anzaldúa-Morales *et al.*, 1983, 1988). El entrenamiento del panel debe iniciarse con un número mayor de personas que el que se necesita para el panel entrenado definitivo, ya que algunos panelistas casi siempre abandonan el grupo por causa de enfermedad o prioridades relacionadas con el trabajo. El panel entrenado definitivo deberá incluir al menos 8 personas que tengan una buena capacidad de discriminación en la prueba a realizarse.

El entrenamiento final supone el empleo de productos alimenticios similares a los que se usarán durante las pruebas reales. Los panelistas deberán acostumbrarse a los rangos de intensidades de las características que encontrarán durante el estudio. Durante el entrenamiento podrán establecerse los mejores procedimientos de preparación y presentación de muestras y podrá diseñarse la tarjeta de calificación o boleta definitiva (Anzaldúa-Morales, 1988).

7.9. Pruebas sensoriales

Existe en la práctica una gran confusión por parte de las personas que no tienen un conocimiento adecuado sobre las técnicas sensoriales, con relación a qué información se necesita según el objetivo que se persigue al realizar un estudio sensorial. En la mayoría de los casos no existe una sola prueba que resuelva el problema y en ocasiones es necesario revisar varias veces el objetivo para tener claro cuál o cuáles métodos hay que aplicar. Con relación a las pruebas que pueden ser utilizadas existen diversas formas de clasificarlas aunque todos los autores coinciden en que éstas se dividen en dos grupos (figura 11): Pruebas Analíticas y Pruebas afectivas.

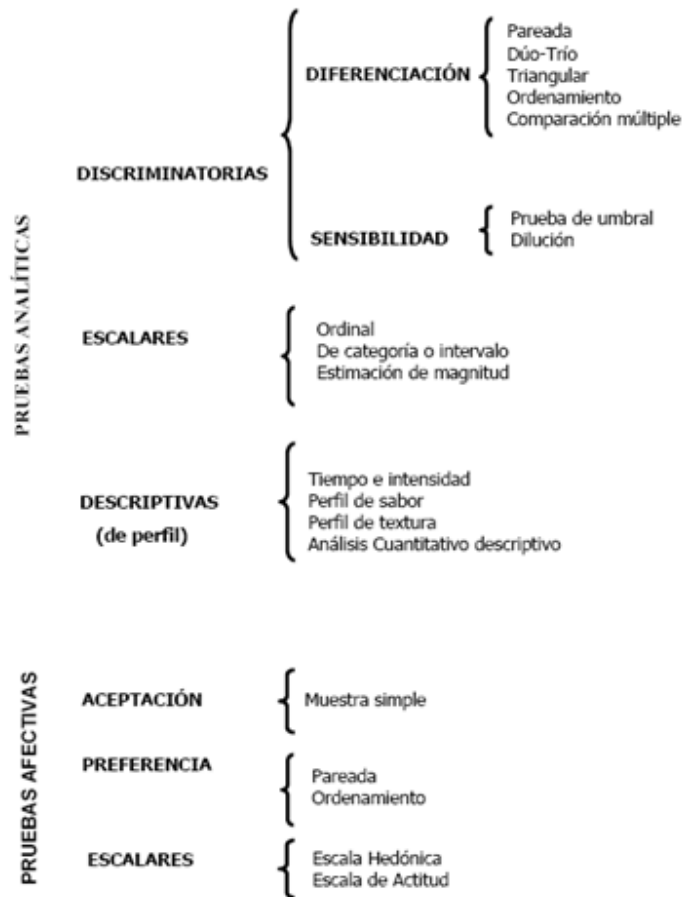


Figura 11. Clasificación de las pruebas sensoriales.

Por otro lado, la información sobre los gustos, preferencias y requisitos de aceptabilidad, se obtienen empleando métodos de análisis adaptados a las necesidades del consumidor y evaluaciones sensoriales con panelistas no entrenados. La información sobre las características sensoriales específicas de un producto requiere pruebas orientadas al producto. La identificación y medición de las propiedades sensoriales es factor esencial en el desarrollo de nuevos productos, reformulación de productos ya existentes, identificación de cambios causados por los métodos de procesamiento, almacenamiento y uso de nuevos ingredientes así como, para el mantenimiento de normas de control de calidad.

Este tipo de información cuantitativa orientada al producto, se obtiene llevando a cabo evaluaciones sensoriales en el laboratorio, con paneles entrenados.

Pruebas Analíticas

Dentro de estas pruebas se encuentran las pruebas orientadas al producto y se realizan en condiciones controladas de laboratorio, estas pruebas son realizadas con jueces que han sido seleccionados y entrenados previamente (jueces analíticos). Las mismas se subdividen en pruebas discriminatorias, escalares y descriptivas. Las pruebas discriminatorias permiten comparar dos o más productos, e incluso estimar el tamaño de la diferencia. Es decir los panelistas entrenados se utilizan para identificar diferencias entre los productos similares o para medir la intensidad de características tales como el olor, sabor (olor y gusto), textura o apariencia. Por lo general estos paneles constan de 5 a 15 panelistas seleccionados por su agudeza sensorial, los que han sido especialmente entrenados para la tarea que se realizará. Los panelistas entrenados no deben evaluar la aceptabilidad del producto, ya que debido a su entrenamiento especial no sólo son más sensibles a las pequeñas diferencias que lo que es el consumidor promedio, sino que también pueden poner a un lado sus preferencias y aversiones cuando están midiendo parámetros sensoriales (Watts *et al.*, 1992)

Pruebas Afectivas

Estas pruebas son conocidas también como pruebas orientadas al consumidor, se realizan con personas no seleccionadas ni entrenadas, las que constituyen los denominados jueces afectivos. Los mismos en la mayoría de los casos se escogen atendiendo a que sean consumidores reales o potenciales del producto que se evalúa, pudiendo tener en cuenta situaciones económicas, demográficas, entre otros aspectos. Las pruebas afectivas se emplean en condiciones similares a las que normalmente se utilizan al consumir el producto, de ahí que puedan llevarse a cabo en supermercados, escuelas, plazas, etc. Por lo general, para este tipo de pruebas se entrevistan de 100 a 500 personas (Watts *et al.*, 1992; Espinosa, 2007)

El cuestionario a emplear es otro elemento que debe ser analizado con rigor, para evitar que éste introduzca errores en los resultados obtenidos. El mismo no debe ser muy extenso para evitar fatiga en los jueces o rechazo a realizar la prueba, además debe ser fácil de responder, redactarse de manera clara con preguntas de fácil comprensión y con impresión legible (Espinosa, 2007).

7.9.1. Pruebas dúo o trío

Para esta prueba se presenta a los panelistas tres muestras simultáneas de las cuales una de ellas está marcada como muestra de referencia con la letra "R" y dos muestras codificadas, de las cuales una de ellas es igual a la muestra patrón y la otra es diferente. El panelista debe diferenciar las muestras codificadas y definir cuál es igual a la muestra patrón. Se le debe indicar al panelista que pruebe primero la muestra de referencia y luego las muestras codificadas (Larmond, 1977).

7.9.2. Pruebas hedónicas

Esta prueba localiza el nivel de agrado que provoca una muestra específica. Se utiliza una escala no estructurada (también llamada escala hedónica), sin mayores descriptores que los extremos de la escala, en los cuales se puntualiza la característica de agrado y se debe incluir siempre el punto central "ni me gusta ni me disgusta". A este punto se le asigna la calificación de cero. A los puntos de la escala por encima de este valor se les otorgan valores numéricos positivos, indicando que las muestras son agradables; en cambio, a los puntos que están por debajo del valor de indiferencia se les asigna valores negativos, correspondiendo a calificaciones de disgusto. Esta forma de asignar el valor numérico tiene la ventaja de que facilita mucho los cálculos, y es posible reconocer al primer vistazo si una muestra es agradable o desagradable (Anzaldúa-Morales *et al.*, 1983)

8. PROCEDIMIENTOS Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Caracterización fisicoquímica de la taberna

La muestra se caracterizó fisicoquímicamente y con perfil de carbohidratos. El pH se midió empleando un potenciómetro OAKLON pH 510 series, los grados Brix se cuantificaron con un refractómetro digital marca ATAGO, modelo Pocket PAL-3.

- Determinación de azúcares reductores

El método empleado para la determinación de los azúcares reductores fue el reportado por Miller (1959), donde a 0.5 mL de muestra se le adiciona 1.5 mL de reactivo DNS. Se incubó en baño maría a 80° C por 15 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le añadieron 8 mL de agua destilada. Finalmente se realizaron lecturas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

- Determinación de azúcares totales

Para la determinación de azúcares totales se empleó la técnica reportada por Dubois *et al.* (1956), en donde a 1mL de la muestra centrifugada se le adicionaron 0.5 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se agitó con cuidado y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se mantuvo en un baño maría a 25° C durante 20 minutos y se leyeron al espectrofotómetro a 490 nm.

- Contenido de alcohol

Las muestras tomadas al final de la fermentación, se centrifugaran durante 10 minutos a 10000 rpm, y el sobrenadante se utilizará para cuantificar la concentración de etanol, empleando un Cromatógrafo de gases (Agilent technologies) con una columna DB-Wax de 60m x 0.25mm x 0.25 µm.

- Cuantificación de ácidos orgánicos

Se determinará el contenido de ácido láctico, ácido acético y ácido málico en la muestras fermentadas utilizando un HPLC con una columna Discovery RP-AmideC16 de 15cm x 4.6 mm x 0.5 µm.

Elaboración del medio sintético

A partir de la caracterización fisicoquímica de la muestra de taberna, se preparó un medio sintético simulando la composición de la savia de la palma de coyol conteniendo principalmente sacarosa y sales minerales (MS) a una concentración de 110 g/L y 4.4 g/L respectivamente.

Obtención del inóculo

Se evaluaron diferentes consorcios microbianos empleando cepas comerciales en forma liofilizada como *Kluyveromyces marxianus* CHR HANSEN, *Lactobacillus casei* 431® CHR HANSEN y *Bifidobacterium-12* ® CHR HANSEN. Así mismo se utilizaron cepas de *Zymomonas mobilis*, *Sacharomyces cerevisiae*, bacterias acéticas y lácticas aisladas de la taberna. Las cepas fueron reactivadas en caldo nutritivo y caldo MRS según sus requisitos nutrimentales. Para la etapa de semillero se utilizó el medio sintético inoculado al 10% y a partir de este cultivo se realizó la fermentación.

Fermentación

En la fermentación el pH se ajustó a 7.5 y los grados brix a 16%. Se probó una concentración de 20 % (2 ml) de inóculo de los diferentes consorcios. La fermentación fue monitoreada cada tres horas en donde se midió el crecimiento microbiano por densidad óptica y parámetros fisicoquímicos como pH, °Brix y acidez. Así mismo se fueron evaluando características sensoriales del producto de la fermentación.

Caracterización microbiológica de la bebida tipo “taberna”

El recuento de microorganismos se realizó por la técnica de vaciado en placa. Se tomó 1 mL de la muestra de la bebida y se diluyó en 9 mL de agua peptonada, posteriormente se realizaron diluciones seriadas las cuales se inocularon en medios selectivos. Las placas se incubaron de acuerdo a sus requerimientos particulares, posteriormente se realizó el conteo de los microorganismos. Para las bacterias ácido lácticas se utilizó medio MRS con cicloheximida, para levaduras el YM con oxitetraciclina, para bacterias acéticas el medio GYC con penicilina, para *Zymomonas* el medio WL con cicloheximida, y para Enterobacterias el medio Mac Conkey.

Entrenamiento de jueces

Se reclutó a personas de entre 18 y 23 años de edad para formar parte del panel de jueces semi-entrenados, a los cuales se les realizaron pruebas de identificación de olores comunes y sabores básicos, así como también se evaluó su capacidad para discriminar diferentes grados de una característica sensorial específica por medio de pruebas discriminatorias como la dúo-trío y la triangular. Al finalizar estas pruebas los jueces probaron su habilidad para discriminar muestras similares a las de estudio. Este entrenamiento se realizó dos veces por semana, cada sesión fue de una hora.

Evaluación sensorial

Se utilizaron jueces semi-entrenados para medir el grado de aceptación de la bebida tipo taberna con una prueba de escala hedónica de 9 puntos. Y la prueba discriminativa dúo-trío para comparar las características sensoriales de la bebida original con la de la bebida obtenida a partir del medio sintético.

9. RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica de la taberna

La muestra fue obtenida de una palma de coyol (*Acrocomia aculeata*) derribada en la colonia Benito Juárez municipio de Villaflores, Chiapas. La savia comenzó a drenar aproximadamente 4 horas después de realizar la incisión en el tronco de la palma colectándose de forma aséptica y en refrigeración al laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Se mantuvo en refrigeración hasta su posterior análisis fisicoquímico, microbiológico y de perfil de carbohidratos.

El pH inicial fue de 7.5, los grados Brix fueron de 11.9 y la densidad fue de 1.0480 g/mL. La figura 12 muestra los valores obtenidos durante la fermentación espontánea de la savia de palma de coyol, hasta la obtención de taberna.

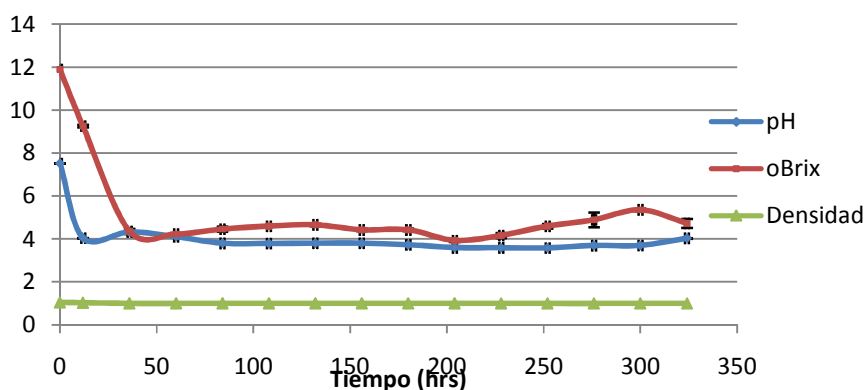


Figura 12. Parámetros fisicoquímicos durante la fermentación de la taberna

La concentración de azúcares totales determinados por el método de fenol-sulfúrico de la muestra de savia fue de 109 g/L, los cuáles descendieron hasta 66.48 g/L durante las primeras 12 horas posteriores a la incisión y drenado de la misma.

El contenido de azúcares reductores obtenidos por la técnica de DNS en la savia fue de 1.02 g/L al inicio de la fermentación. A las 12 h la concentración aumentó

hasta 23.61 g/L, esto posiblemente debido a la hidrólisis de la sacarosa durante la fermentación de la taberna.

De acuerdo al análisis realizado por HPLC, la savia extraída durante el primer drenado de la canoa no contenía alcohol, sin embargo si se obtuvo una concentración de ácido acético de 0.1125 g/L para esa misma muestra. Estos resultados confirman lo obtenido en la caracterización microbiológica, en donde se observó la presencia de microorganismos tales como levaduras, mesofílicos, bacterias lácticas, bacterias del género de *Zymomonas* y bacterias acéticas. Todas ellas en una concentración del orden de 1×10^5 UFC/mL de muestra. En la figura 13 se muestra la cinética microbiana obtenida durante la fermentación de la taberna *in vivo* y se observa la presencia de todos los microorganismos al tiempo cero.

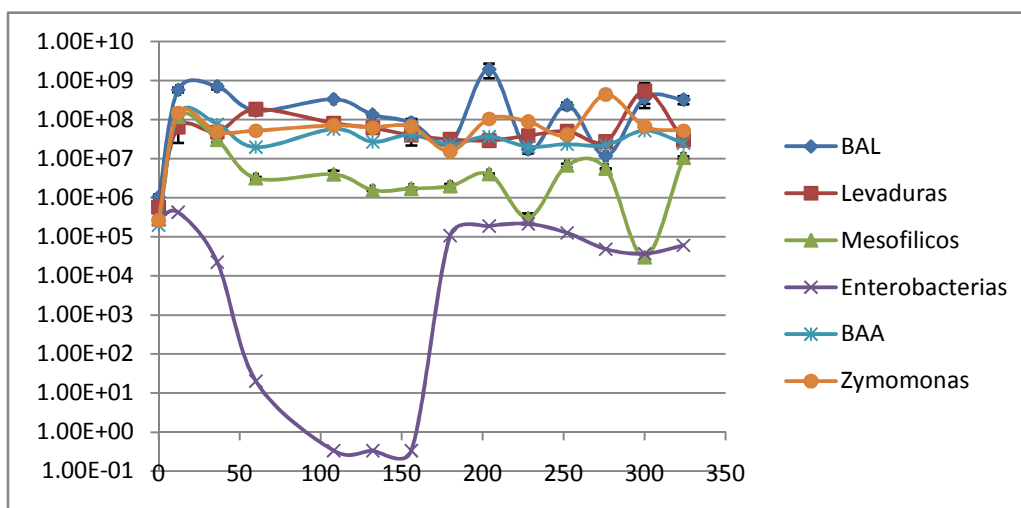


Figura 13. Cinética microbiana durante la producción in vivo de taberna.

La presencia de estos microorganismos se debe a contaminación cruzada durante la realización de la canoa en el tronco de la palma, es decir, dichos microorganismos provienen del medio ambiente, de los utensilios empleados para el corte, del manipulador y algunas ellas como las bacterias acéticas pueden ser microorganismos endófitos de la misma planta.

Elaboración del medio sintético

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de la savia, se elaboró el medio sintético conteniendo sacarosa a una concentración de 110 g/L y se le agregaron 4.4 g/L de sales del medio MS. El pH se ajustó a 7.5, se esterilizó en autoclave y se inóculo con los consorcios microbianos.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos durante la evaluación de los diversos consorcios microbianos. De manera general, se observó que el pH descendió hasta valores de 2.1-2.3 en las primeras 24 horas de fermentación para los primeros tres consorcios microbianos. Este comportamiento afectó las características sensoriales del producto fermentado, ya que no fueron similares a las de la taberna elaborada en forma natural. En todos los experimentos, predominaba el olor y sabor a lácteo, esto se puede interpretar como que las bacterias lácticas fueron las que crecieron en mayor proporción produciendo como metabolito principal el ácido láctico y por consiguiente acidificar el medio de cultivo hasta los valores obtenidos, con ello se inhibió a su vez a los otros microorganismos presentes.

Las cepas empleadas fueron compradas en forma liofilizada, reactivadas e inoculadas en el medio sintético, sin embargo son microorganismos empleados en la industria de lácteos para la elaboración de quesos, yogurt y algunas bebidas fermentadas, y los productos de la fermentación no fueron los esperados para la producción de la bebida tipo “taberna”.

Tabla 5. Consorcios microbianos para la obtención de la bebida tipo “taberna”.

Consortios	Tiempo (h)	Sabor	Color	olor	Brix	pH
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CHR HANSEN , <i>Lactobacillus casei</i> 431® CHR HANSEN y <i>Bifidobacterium-12</i> ® CHR HANSEN, <i>zymomonas mobilis</i> ,BAA	0	Muy dulce	Amarillo transparente	Levadura de pan	10.5	3.5
	10	Muy dulce	Amarillo transparente	Ligeramente a alcohol	10.2	2.7
	23	dulce	Blanco	Ligeramente a alcohol	9.5	2.2
	34	ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	8.8	2.2
	48	ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	7.4	2.1
<i>L.casei</i> 431® CHR HANSEN, <i>Bifidobacterium -12</i> ® CHR HANSEN, <i>Kluyveromices marxianus</i> CHR HANSEN ,BAA	0	Muy dulce	Amarillo transparente	Levadura de pan	10.5	3.3
	10	Muy dulce	amarillo transparente	Ligeramente a alcohol	10.3	2.7
	23	taberna tierna	Blanco	Ligeramente a alcohol	9.4	2.3
	34	ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	8.4	2.2
	48	ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	7.5	2.2
<i>L.casei</i> 431® CHR H, <i>Bifidobacterium -12</i> ® CHR HANSEN, , <i>Kluyveromices marxianus</i> CHR HANSEN, <i>zymomnas mobilis</i>	0	Muy dulce	Amarillo transparente	Sin olor	10.4	3.4
	10	Muy dulce	Amarillo transparente	Ligeramente alcohol	10	2.6
	23	Dulce	Blanco	Ligeramente alcohol	9.4	2.2
	34	Ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	8.1	2.2
	48	Ligeramente a alcohol	Blanco	Ligeramente a alcohol	7.6	2.1
<i>L.case</i> 431® CHR H i, <i>Bifidobacterium -12</i> ® CHR HANSEN , <i>zymomnas mobilis</i> ,BAA	0	Muy dulce	Amarillo transparente	Sin olor	10.5	3.5
	10	Muy dulce	Amarillo transparente	Lácteo rancio	10.2	3.3
	23	Lácteo rancio	Blanco	Lácteo rancio	9.7	3.3
	34	Lácteo rancio	Blanco	Lácteo rancio	9.3	2.9
	48	Lácteo rancio	Blanco	Lácteo rancio	9.3	2.8

En la figura 14 se observa que los grados Brix no disminuyeron considerablemente durante la fermentación, esto también puede indicar que los microorganismos fueron inhibidos por la acidez del medio.

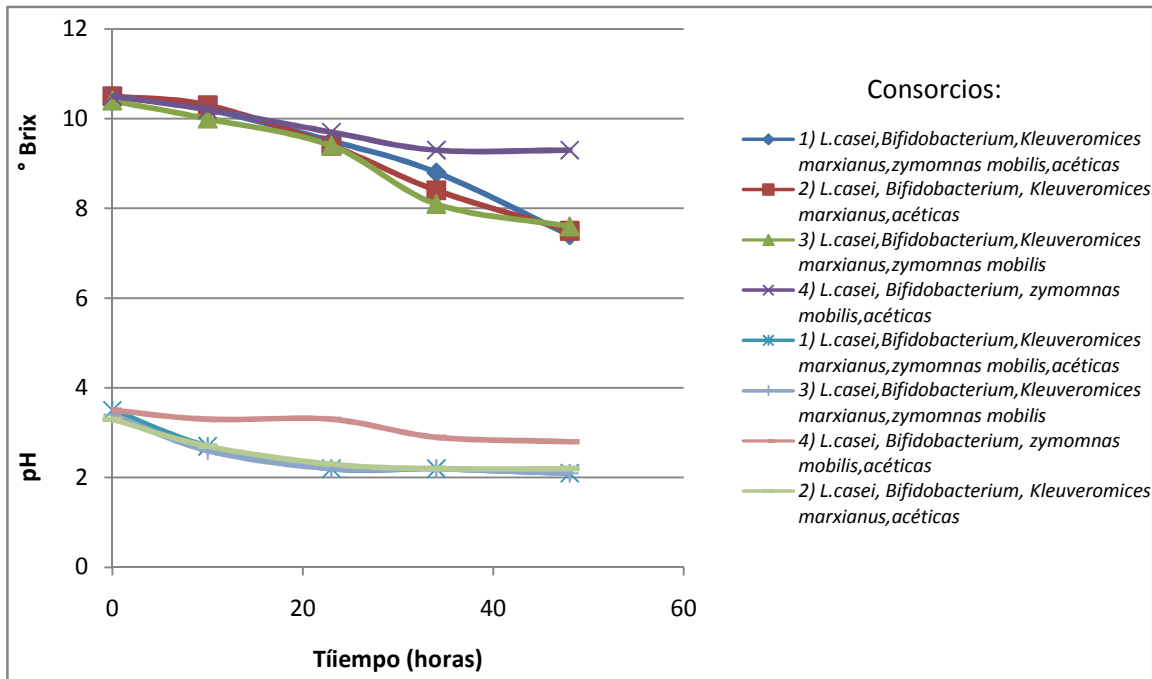


Figura 14. Cinéticas de pH de los consorcios.

Además puede también deberse a que los microorganismos no son tan afines a la sacarosa, *L. casei* 431® CHR H metabolizan mejor la glucosa y *Zymomonas mobilis* la metaboliza la glucosa y fructosa. Tales microorganismos son anaerobios al igual que *Bifidobacterium* -12® CHR HANSEN, por lo que el oxígeno no les facilitó crecer y no realizar procesos fermentativos.

Para corroborar el crecimiento de los microorganismos se realizaron fermentaciones individuales en el medio de cultivo sintético. El crecimiento se corroboró por densidad óptica observando que los microorganismos no fueron capaces de reproducirse en un periodo inicial de 12 h, tiempo característico en la fermentación natural de la palma *in vivo*.

La producción de ácido acético se determinó por titulación con NaOH al 0.1N. Se observó un incremento en la concentración a partir de las 4 h, sin embargo no se alcanzaron los valores reportados por Alcántara *et al.* (2010) característicos de la taberna.

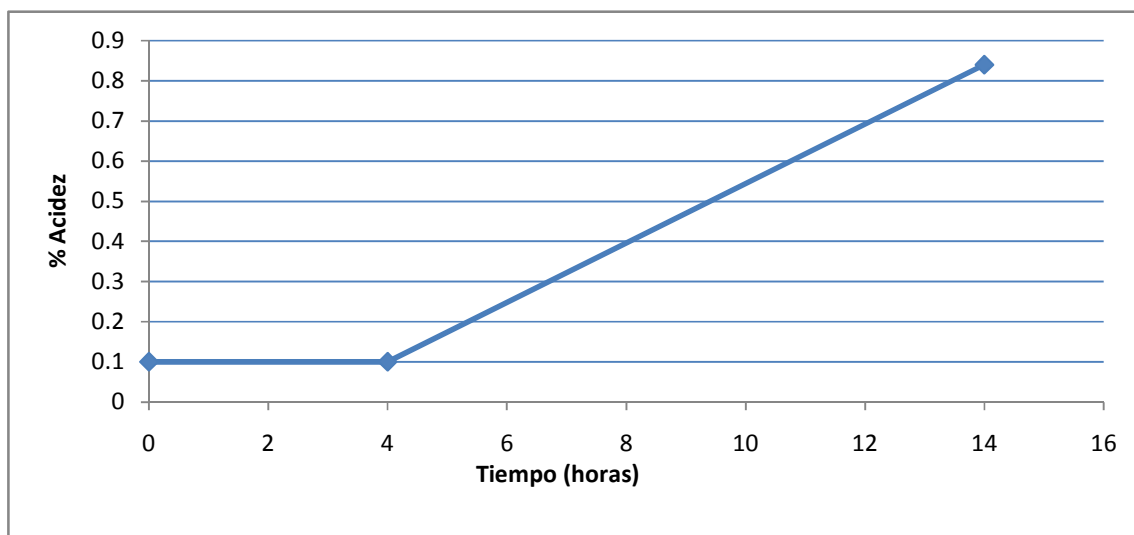


Figura 15. Cinéticas de acidez titulable producidas por las BAA.

10. CONCLUSIÓN

La información obtenida de la caracterización fisicoquímica y del perfil de carbohidratos realizados no permitió elaborar un medio sintético óptimo para la producción de la bebida “tipo taberna”. Se recomienda utilizar cepas aisladas directamente de la taberna natural para asegurar la producción de los metabolitos primarios y secundarios que le confieren las características sensoriales adecuadas.

Es necesario realizar la determinación de minerales por Espectrofotometría de Plasma acoplada inductivamente, el perfil de carbohidratos por HPLC y un perfil de aminoácidos para proveer al medio de cultivo los nutrientes necesarios para la fermentación del consorcio microbiano.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman, D.(1990). A natural history of senses. Random House. New York.

Adeoye, B.I.M., A. Akpuonum y P. Akubor (1991). Effects of variables on the quality of cashew wine.J.Agric.Sci.Tech.,1:66-69.

Alcántara-Hernández, R., Rodríguez-Álvarez, J., Valenzuela-Encinas, C., Gutiérrez-Miceli, F., Castañón-González, H., Marsch, R., Ayora-Talavera, T. and

Dendooven, L. (2010). The bacterial community in '*taberna*' a traditional beverage of Southern Mexico. Letters in Applied Microbiology, 51: 558–563.

Alfenore, S., X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve, S. E. Guillouet. (2004). Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 537–542.

Alper, H., J. Moxley, E. Nevoigt, G. R. Fink, G. Stephanopoulos (2006) Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* 314: 1565–1568.

Amoa-Awua, W.K., Sampson, E. y Tano-Debrah, K(2006). Growth of yeasts, lactic and acetic bacteria in palm wine during and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of applied microbiology* 102: 599-606.

Anzaldúa-Morales, A. (1988). Entrenamiento de jueces para evaluación sensorial.1. Universidad Autónoma de Chihuahua Facultad de Ciencias Químicas. División de Estudios de Postgrado. Chihuahua, Chih., México, D.F.

Anzaldúa-Morales, A.,Lever,C. y Vernon, E.J. (1983). Nuevos métodos de evaluación sensorial y su aplicación en reología y textura. *Tecnol. Aliment* 18 (5),4.

Asai, T. (1968). Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities. University of Tokyo Press, Tokyo, and University Park Press, Baltimore.

Au Du, O.J. (2010). Comparative Studies of Wine Produced by Spontaneous and controlled Fermentation of Preserved Cashew (*Anacardium occidentale*). Journal of Biological Sciences 5(7):460-464.

Balik Michael J (1990). Production of coyol wine from *Acrocomia Mexicana* (Arecaceae) in honduras. New York.

Basic,Jeremia L.J. y Kurmann, S.A. 1983. The fermentation of Hexoses. In bifidobacteria and Their Role (pp. 35-42.) Birkhäuser Verlag. Basel/Boston/Stuttgart.

Bassir O. (1962). Observation of Palm wine. West Afr. J. Biol. Appl. Chem. 6:20-25.

Bechem EET, Omoloko C, Nwaga D, Titanji VPK. (2007). Characterization of palm winw yeasts using osmotic, ethanol tolerance and the isozyme polymorphism of alcohol dehydrogenase. Afr. J. Biotechnol. 6: 1715-1719.

Belaich, I.P., Senez, J.C. (1995). Influence of aeration and of pantothenate on grwth yields of *Zymomonas mobilis*. J.Bacteriol. 89:1195.

Cabrera-Chacón T (1991). Plantas de Chiapas: usos, valores e importancia. El Coyol. No.6, Yashte del IHN. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. p.14.

Crane E. (1975). Honey: Wines from the fermentation of Honey (1975). Heinemann, London. pp.400.

Cross, H.R., Moen, R. y Stanfield, M.S. (1978). Training and testing of judges for sensory analysis of meat quality. Food Technol. 32, 48.

De ley J., Gillis M. y Swings J. (1984). Family VI. Acetobacteraceae En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Edición Krieg N. R. y Holt J. C. Williams & Wilkins , Baltimore. 267- 278 pp.

De ory I., Romero L. y Cantero D. (1998b). Modelling the kinetics of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 189-193.

De ory I., Romero L. y Cantero D. (2002). Optimum starting- up protocol of a pilot scale acetifier for vinegar production. *J. of Food Engineering.* 52:31-37.

DeFranca, F.P., Leite, S.G.F. (1989). Intracellular ethanol and cell viability of *Zymomonas mobilis* during fed-batch alcoholic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5:43.

Deppenmeier U., Hoffmeister M. y Prust C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 60: 233-242.

Doelle, H.W., Kenedy, L.D., Doelle, M.B. (1991). Scale-up of ethanol production from sugar cane using *Zymomonas mobilis* . *biotechnol. Letts.* 13:131.

Dombek, K.M, L. O. Ingram (1986). Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. and Env. Microbiol.* 2(5): 975-981.

Du toit W. y Lambrechets G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology.* 74: 54-64.

Espinosa, Manfugás Julia. Editorial Universitaria. (2007). Cuba. Evaluación Sensorial de los Alimentos. Pp. 2-4.

Faparusi, S I (1966). A biochemical study of palm-wine from different varieties of *Elaeis guineensis*. Ph.D. Thesis, University of Ibadan, Nigeria.

Fregapane G., Rubio-Fernández H., Nieto J. y Salvador M. (1999). Wine vinegar using a noncommercial 100- litre column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering* 63: 141-146.

García SR (2003). Las levaduras en la alimentación de porcinos (*Saccharomyces cerevisiae*). Biotecap, S.A. de C.V. www.engromix.com

Graeme, M. W., H. D. John (1980). Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J. Cell Sci.* 42: 329-356.

Hartley, C.W.S. (1984). The oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq, 2nd Edn. pp.600-603. London: Longman Group Ltd.

Hu, C.K., F. W. Bai, L. J. An (2003b). Enhancements in ethanol tolerance of a self flocculating yeast by calcium ion through decrease in plasmalemma permeability. *Chin. J. Biotechnol.* 19: 715–719.

Hu, C.K., F.W. Bai, L. J. An (2003a). Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg²⁺ via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnol. Lett.* 25:1191–1194.

Ikenebomeh, M., E.C. Madagwu, (2001). Microbiology of wine produced from preserved cashew. (*Anacardium occidentale*). Apple juice. *Nig. J. Microbiol.*, 15:73-81.

Jones, C.W., Doelle, H.W. (1991). Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:4-9.

Jones, R.P., N. Pamment, P.F. Greenfield (1981). Alcohol fermentation by yeasts – the effect of environmental and other variables. *Process. Biochem.* pp.42-49.

Larmond, E. (1977). Laboratory methods for sensory evaluation of foods. Can. Dept. Agr., Publ. 1637.

Leveau J.Y., Bouix, M., (2000). Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial, 1ª edición. Zaragoza, España, Editorial Acribia. p 595.

Lin, Y. y S. Tanaka (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:627–42.

LLaguno C. y Polo C. (1991). El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. España. 238 p.

Looder , J. The yeasts (J. Looder, Ed.). North-Holland Publishing Co. Amsterdam (1970).

Lu s., Lee F. y Chen H. (1999). A thermotolerant and high acetic acid producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. *J. of Applied Microbiology* 86:55-62.

Maldonado, O., Rolz y S.S. de Cabrera (1975). Wine and vinegar production from tropical fruits. *J. Food Sci.*,40:262-265.

Maldonado-Mares G. (1992). Frutas Tropicales de Tabasco, Centro de Investigación de Ciencias Biológicas Unidad Sierra, Editorial Impresory Distribuidora S.A., Villahermosa, Tabasco. p.100.

Mc Currach CJ (1977). Palms of the world. Harper Brothers. New York, USA p. 45.

Miran F (1975). La vegetación de Chiapas. Vol 1, 2ª. Edición. Ediciones del Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. P. 235-236.

Moya-León, M.A., Moya, M., Herrera, R. (2004). Ripening of the Chilean papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. *Postharvest Biology and Technology* 34: 211-218.

Nabais, R.C., I. Sa-Correia., C.A. Viegas, J.M. Novais (1988). Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2439–2446.

Obire O. (2005). Activity of yeast species in palm sap obtained from three areas in Edo state, Nigeria. *J Appl Sci Environ Manage*; 9: 25-30.

Ogbulie, T.E., Ogbulie, J.N., y Njoku, H.O (2007). Comparative study on the microbiology and shelf life stability of palm wine from *Elaeis guineensis* y *Rhaphia hookeri* obtained from Okigwe, Nigeria.

Okafor, N. (1972). Palm wine yeast from parts of Nigeria. *J. Food Sci. Agric.* 23:13991407.

Okafor, N. (1975a). Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. *Journal of Applied Bacteriology* 38, 1-7.

Okafor, N. (1975b). Microbiology of Nygerian palm wine with particular reference to the bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 38, 81-88.

Okafor, N. (1977). The microbiological method fro palm wine preservation. *J. Appl.Bact.* 43: 159-161.

Okafor, N. (1987). Microbiology and biochemistry of oil palm wine. *Adv. Appl. Microbial.* 24:237-255.

Pelczar MJ, Reid R. (1993). *Microbiología*. 2ª. Edición. México, Editorial McGraw-Hill, Capitulo 16, p 271-286.

Ratnam, V. V., S. R. Bandaru, S. R. Somalanka, D. R. Mendu, S. B. Imandi, S. R. Benjawada, N. R. Medicherla, T. Devarajan, J. Karothi y A. Chityala (2007). Optimization of fermentation parameters to enhance the production of ethanol from

Palmyra jaggery using *Saccharomyces cerevisiae* in a batch fermentor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143: 224-235.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnick, M.L. (1982). Etanol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 23:37.

Rose, A.H y Harrison, J.S. (1969). The yeast. 3 vols. Academic Press. London and New York.

Rutz, D. y R. Janssen (2007). Biofuel technology handbook. E. Silvensteinstr (ed.). Munchen, Germany. pp. 40-70.

Sharpe M. E. (1981). The genus *Lactobacillus*. En the prokaryotes (Starr, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel, eds.). Springer Verlag. Berlin (pp.1655 1680).

Supanwong, K., Ohta, K., Hayashida, S. (1983). Environmental effects of ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Microbial Utilization of Renewable Resources.* 3: 122.

Surnark, K.; Mc. Walters, K. H. y Philipps, R. D. (1998). Acceptance by American and Asian consumers of extruded fish and peanut snack products. *J. Food Science.* 63(4), 721- 725.

Tesfaye W., Morales M., Troncoso A. y García-Parrilla M. (2002). Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology.* 13:12-21.

Timoshin, A.A., Rapoport, A. L., Beker, M.E. (1989). Effect to temperature on the state of lipids in the external membrane of *Zymomonas mobilis* during growth. *Mikrobiologiya.* 58:576.

Uzochukwuru BUA, Balogh FE, Ngoddy PD (1991). Standard pure culture inoculums of natural fermented Palm sap. *Nig. J. Microbiol.* 9: 67-77.

Uzogara SG, Agu LN, Uzogara E O (1990). A review of traditional fermented food condiments and beverages in Nigeria. Their Benefits and possible problems. *Ecol. Food Nutrient*. 24:267-288.

Vesna, S., G. Z. Vlatka , S. Damir , G. Slobodan y V. Nada (2004). Zinc, Copper and Manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* 42(2):115-120.

Viikari L. (1988). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *Crit Rev Biotechnol.* 3(7):237-61.

Watts, B.M., Ylimaki, G.L., Jeffery, L. E., Elías, L.G. (1992). *Basic Sensory Methods for Food*. Ed. Evaluation. International Development Research Centre. Ottawa, On., Canada. ISBN: 0-88936-564-4

Williams y Wilkings (1984). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol.II. Baltimore/London.

Zuart-Macías L, Ponce-Díaz P, Santiago Marroquín G, Quiroga-Madrigal R. (1999). Coyol palm (*Acrocomia mexicana*), a phylogenetic resource from Chiapas, México. II international Symposium on Ornamental Palms & other Monocots from the Tropics. En: ISHS Acta Horticulturae 486. Editor Caballero-Ruano M, Tenerife, España.