



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA
DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL
JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*)
PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA**

Jaime Ernesto Catalán Garrido

Asesorado por el Ing. César Alfonso García Guerra

Guatemala, junio de 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA
DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL
JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*)
PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

JAIME ERNESTO CATALÁN GARRIDO
ASESORADO POR EL ING. CÉSAR ALFONSO GARCÍA GUERRA

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, JUNIO DE 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Enrique Alfredo Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Walter Rafael Véliz Muñoz
VOCAL V	Br. Sergio Alejandro Donis Soto
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. César Alfonso García Guerra
EXAMINADOR	Ing. Jaime Domingo Carranza González
EXAMINADORA	Inga. Dinna Lissette Estrada Moreira
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

**EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA
DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL
JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*)
PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA**

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha de enero de 2013.



Jaime Ernesto Catalán Garrido



Guatemala, 16 de mayo de 2013

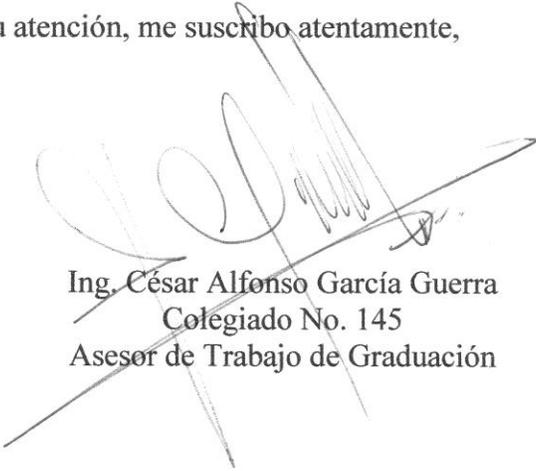
Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
Dirección
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente

Respetable Ing. Monzón:

Deseando que sus labores se realicen con éxito, dirijo la presente para hacer de su conocimiento que he revisado y aprobado el informe final del Trabajo de Graduación titulado **“EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*) PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA”**, el cual se llevó a cabo por el estudiante de Ingeniería Química **Jaime Ernesto Catalán Garrido**, identificado con el carné No. **2007-14598**.

Considerando que dicho documento cumple satisfactoriamente con los requisitos exigidos, solicito sirva darle continuidad al proceso para su aprobación.

Agradeciendo su atención, me suscribo atentamente,


Ing. César Alfonso García Guerra
Colegiado No. 145
Asesor de Trabajo de Graduación

César Alfonso García Guerra
INGENIERO QUÍMICO
COLEGIADO No. 145



Guatemala, 17 de mayo de 2013
Ref. EI.Q.TG-IF.027.2013

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el Acta TG-072-2012-IF le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por el estudiante universitario: **Jaime Ernesto Catalán Garrido.**

Identificado con número de carné: **2007-14598.**

Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO.**

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*) PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por el Ingeniero Químico: **César Alfonso García Guerra.**

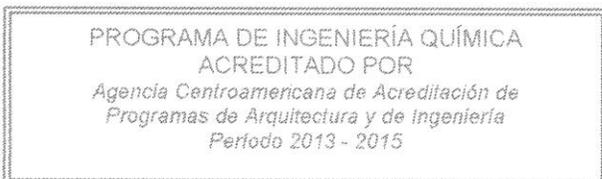
Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

“ID Y ENSEÑADA A TODOS”

Licda. Ingrid Lorena Benítez Racheco
COORDINADORA DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **JAIME ERNESTO CATALÁN GARRIDO** titulado: **"EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*) PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.



Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, junio 2013

Cc: Archivo
VMMV/ale

Universidad de San Carlos
de Guatemala



Facultad de Ingeniería
Decanato

DTG. 432 .2013

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **EVALUACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS GRANOS DE TIBICOS UTILIZANDO COMO SUSTRATO ÚNICO EL JUGO DEL EJE DE LA INFLORESCENCIA DE LA PIÑA (*Ananas comosus*) PARA SER APROVECHADO COMO POSIBLE BEBIDA PROBIÓTICA**, presentado por el estudiante universitario **Jaime Ernesto Catalán Garrido**, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

A large, handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos', written over a large, empty oval shape.

Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
Decano

Guatemala, 21 de junio de 2013

/gdech



ACTO QUE DEDICO A:

Dios

Por ser el creador y el pilar fundamental de mi vida; por las bendiciones otorgadas; por la ayuda y protección brindada; por ser el amigo y guía eterno, porque sin Él nada sería posible.

Virgen María

Por ser la madre de Dios y madre mía por excelencia; por interceder, guiar, bendecir y proteger siempre mis pasos por el buen camino.

Mi abuela

María Julia López, por todo el amor y el esfuerzo empleado para formarme de la mejor forma física, intelectual, emocional y espiritualmente; por saber transmitir grandes valores a través de su ejemplo; por ser un modelo de vida; por su inmenso corazón; por su gran fortaleza; por ser toda una madre para mí; porque hoy puede estar tranquila, feliz y orgullosa de haber cumplido con creces su promesa.

Mi abuelo

Jaime Ernesto Catalán Molina (q.e.p.d.), porque a pesar del largo tiempo de su partida, inculcó en mí diversos valores personales, sociales, profesionales y espirituales.

Mi padre

Jaime Ernesto Catalán López (q.e.p.d), por haber dado lo mejor de sí, siempre y hasta el último momento, a favor de mi bienestar y desarrollo en absolutamente todos los aspectos. Por siempre en mi mente y corazón.

Mi madre

Blanca Eugenia Garrido Soto, por cada segundo de amor, apoyo, dedicación y esfuerzo incondicional empleado en mí; por ser ejemplo de carisma, fe, humor, optimismo, realismo y responsabilidad en todo momento y ante cualquier situación.

Mi hermana

María Marlene Catalán Garrido, por la compañía y la confianza expresada; porque a pesar de nuestras diferentes personalidades, siempre contaremos el uno para el otro.

Mi tío

Luis Fernando Catalán López, por el apoyo, la atención, el cariño, la compañía, la confianza, los consejos, la dedicación y el esfuerzo expresados de múltiples formas.

Mi tía

Julia Isabel Catalán López, por la atención, el cariño, la compañía y la dedicación brindados en el transcurso de mi desarrollo.

Mi abuela

Blanca Anita Soto, por el cariño, la atención y el apoyo demostrados.

AGRADECIMIENTOS A:

Mis amistades

Por el afecto sincero y desinteresado, el cual hemos sabido cultivar y fortalecer a lo largo del tiempo; por la gran variedad de emociones y experiencias compartidas; por el apoyo brindado; porque sin seres como ustedes, este camino hubiera sido muy difícil y aburrido.

Brenda Barrios Fernández y familia

Por todo el cariño, apoyo y confianza brindados; por hacerme sentir parte de su hogar; por ser simplemente grandes seres humanos.

Ing. César A. García

Por ser parte fundamental en mi formación profesional; por compartir tantos y tan valiosos conocimientos; por su apoyo, dedicación y paciencia; por las experiencias compartidas; por su confianza.

Licda. Ingrid Benítez

Por el apoyo, confianza y cariño expresados; por la motivación y los consejos brindados; por las experiencias compartidas; por su amistad.

Inga. Hilda Palma

Por el apoyo, confianza y cariño expresados; por los conocimientos compartidos; por la motivación y los consejos brindados; por su amistad.

Ing. Pablo Morales

Por los conocimientos, confianza y apoyo brindados durante la ejecución de este proyecto.

Dra. Virginia Bolaños

Por los conocimientos y el apoyo brindados durante la ejecución de la presente investigación.

Alimentos

Montesol, S. A.

Por el apoyo brindado; por haber sido un elemento fundamental para la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTADO DE SÍMBOLOS.....	IX
GLOSARIO.....	XI
RESUMEN.....	XVII
OBJETIVOS/HIPÓTESIS.....	XIX
INTRODUCCIÓN.....	XXIII
1. MARCO CONCEPTUAL.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	7
1.3. Determinación del problema.....	8
1.3.1. Definición.....	8
1.3.2. Alcances y límites del problema.....	8
1.3.2.1. Alcances.....	8
1.3.2.2. Límites.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1. Piña.....	11
2.1.1. Origen.....	11
2.1.2. Características.....	11
2.1.3. Contenido nutricional.....	13
2.1.4. Utilización.....	15
2.1.5. Subproductos.....	16
2.1.6. Producción nacional.....	16
2.2. Tibicos.....	17

2.2.1.	Origen.....	17
2.2.2.	Características	18
2.2.3.	Nombres comunes	21
2.2.4.	Microorganismos presentes	22
2.3.	Fermentación	24
2.3.1.	Catabolismo de los carbohidratos	25
2.3.2.	Fermentación láctica	30
2.3.3.	Fermentación acética	32
2.3.4.	Fermentación alcohólica.....	33
2.3.5.	Uso como método de preservación	34
2.4.	Alimentos fermentados.....	35
2.4.1.	Microorganismos importantes	36
2.4.1.1.	Bacterias ácido-lácticas	37
2.4.1.2.	Bacterias ácido-acéticas.....	39
2.4.1.3.	Levaduras.....	40
2.4.1.4.	Requerimientos nutricionales	42
2.4.1.5.	Desarrollo microbiológico	43
2.4.2.	Características de los alimentos fermentados.....	46
2.5.	Alimentos probióticos	48
2.5.1.	Microbiota intestinal.....	49
2.5.2.	Microorganismos probióticos.....	50
2.5.2.1.	Características deseables	51
2.5.2.2.	Dosificación	52
2.5.2.3.	Viabilidad.....	53
2.6.	Técnicas de preservación	53
2.6.1.	Asepsia.....	54
2.6.2.	Desinfección.....	55
2.6.3.	Esterilización	56
2.6.4.	Refrigeración	57

2.7.	Análisis cuantitativos	58
2.7.1.	Físicos	58
2.7.1.1.	Peso drenado.....	58
2.7.1.2.	Peso seco	59
2.7.1.3.	Densidad relativa	59
2.7.2.	Químicos.....	61
2.7.2.1.	Acidez total titulable	61
2.7.2.2.	Acidez activa.....	62
2.7.3.	Microbiológicos	63
2.7.3.1.	Recuento de microorganismos	63
3.	MARCO METODOLÓGICO	65
3.1.	Variables.....	65
3.2.	Delimitación del campo de estudio	66
3.3.	Recursos humanos disponibles.....	68
3.4.	Recursos materiales disponibles	68
3.5.	Técnica cuantitativa	71
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información	72
3.6.1.	Preparación del inóculo	72
3.6.1.1.	Obtención	72
3.6.1.2.	Acondicionamiento.....	72
3.6.2.	Preparación del sustrato.....	73
3.6.2.1.	Obtención	73
3.6.2.2.	Extracción del jugo.....	73
3.6.2.3.	Filtración	74
3.6.2.4.	Esterilización.....	74
3.6.3.	Preparación de los fermentadores.....	75
3.6.3.1.	Esterilización.....	75
3.6.4.	Fermentación.....	76

3.6.4.1.	Inoculación	76
3.6.4.2.	Incubación	76
3.6.5.	Análisis cuantitativos	78
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.....	82
3.8.	Análisis estadístico.....	86
3.9.	Plan de análisis de resultados.....	91
3.9.1.	Métodos y modelos de los datos	91
3.9.2.	Programas para el análisis de datos	91
4.	RESULTADOS	93
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	105
	CONCLUSIONES.....	117
	RECOMENDACIONES	121
	BIBLIOGRAFÍA.....	123
	APÉNDICES.....	133
	ANEXOS.....	175

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Morfología del fruto de la piña de la variedad Cayena lisa	12
2.	Fruto de la piña.....	13
3.	Productos de la piña	15
4.	Estructura interna y externa de un grano de tibico fracturado	18
5.	Capa externa de un grano de tibico presentando bacterias y levaduras	19
6.	Proceso de fisión de un grano de tibico.....	20
7.	Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)	26
8.	Ruta Entner-Duodoroff (ED)	27
9.	Ruta Fosfocetolasa (ruta heteroláctica).....	28
10.	Principales destinos del piruvato	29
11.	Estructura del ácido láctico	30
12.	Reducción del piruvato a lactato.....	31
13.	Estructura del ácido acético.....	32
14.	Oxidación del etanol a ácido acético.....	32
15.	Estructura del etanol.....	33
16.	Transformación del piruvato a etanol.....	34
17.	Géneros de bacterias ácido-lácticas y sus propiedades.....	38
18.	Gemación de las levaduras y cicatrices visibles de gemaciones anteriores.....	40
19.	Curva de desarrollo microbiológico.....	44
20.	Relación de temperatura-tiempo en los procesos térmicos de esterilización	56

21.	Relación de temperatura-presión en la esterilización por vapor	57
22.	Diluciones en serie para el recuento en placa	63
23.	Diseño general para la técnica cuantitativa	71
24.	Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo	93
25.	Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo ...	94
26.	Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo.....	95
27.	Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo.....	96
28.	Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo ...	97
29.	Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,015 g/mL, en función del tiempo de fermentación	98
30.	Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,030 g/mL, en función del tiempo de fermentación	99
31.	Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,060 g/mL, en función del tiempo de fermentación	100

TABLAS

I.	Información nutricional promedio de las variedades tradicionales de piña.....	14
II.	Algunas cepas encontradas en muestras de tibicos.....	23

III.	Definición operacional y descripción de las variables independientes.....	65
IV.	Definición operacional y descripción de las variables dependientes	66
V.	Variación de las concentraciones de granos de tибicos inoculados.....	76
VI.	Identificación de las fermentaciones simultáneas para cada proceso fermentativo	77
VII.	Identificación y distribución de los análisis cuantitativos para cada proceso fermentativo.....	78
VIII.	Formulario para la tabulación y el ordenamiento de los análisis físicos y químicos.....	83
IX.	Formulario para la tabulación y el ordenamiento de los análisis microbiológicos	83
X.	Formulario para la tabulación y el ordenamiento de las titulaciones potenciométricas.....	84
XI.	Tratamiento experimental de los análisis físicos y químicos.....	84
XII.	Tratamiento experimental de los análisis microbiológicos	85
XIII.	Tratamiento experimental comparativo de los análisis físicos y químicos	85
XIV.	Tratamiento experimental comparativo de los análisis microbiológicos	86
XV.	Arreglo general de un análisis de varianza de dos factores.....	87
XVI.	Fórmulas para el análisis de varianza de dos factores con interacción	90
XVII.	Expresiones matemáticas para la concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo.....	101

XVIII.	Expresiones matemáticas para la concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo	101
XIX.	Expresiones matemáticas para la densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo.....	102
XX.	Expresiones matemáticas para la acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo.....	102
XXI.	Expresiones matemáticas para la acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo	103
XXII.	Expresiones matemáticas para las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,015 g/mL, en función del tiempo de fermentación.....	103
XXIII.	Expresiones matemáticas para la poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,030 g/mL, en función del tiempo de fermentación.....	104
XXIV.	Expresiones matemáticas para las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,060 g/mL, en función del tiempo de fermentación.....	104

LISTADO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
pH	Acidez activa (potencial de hidrógeno)
BAL	Bacterias ácido-lácticas
L_{Ac}	Concentración de ácido láctico
m_d	Concentración de la biomasa drenada
m_s	Concentración de la biomasa seca
pKa	Constante de equilibrio de disociación ácida
SC	Cuadrado medio
ρ_r	Densidad relativa
°Bx	Grados Brix
°C	Grados centígrados
GL	Grados de libertad
g	Gramos
H₁	Hipótesis alternativa
H₀	Hipótesis nula
h	Horas
H	Humedad
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramo
kW	Kilowatts
L	Litro
Log₁₀	Logaritmo de base 10
BAL_{Log}	Logaritmo de base 10 de la población de bacterias ácido-lácticas

L_{Log}	Logaritmo de base 10 de la población de levaduras
µg	Microgramos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molaridad (mol/L)
Y_{iXy}	Observación en la <i>i</i> -réplica, <i>x</i> -concentración de inóculo y <i>y</i> -tiempo
%	Porcentaje
P	Probabilidad
\bar{Y}_{Xy}	Promedio de las observaciones de la <i>x</i> -concentración y <i>y</i> -tiempo
F	Prueba F de Fisher
“	Pulgada
Q	Quetzales
SC	Suma de cuadrados
T_{Xy}	Suma de las observaciones de la <i>x</i> -concentración y <i>y</i> -tiempo
θ_F	Tiempo de fermentación
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UI	Unidad internacional

GLOSARIO

Antilipidémico	Agente que reduce el nivel de grasa en la sangre
ATP	Nucleótido fundamental en la transformación de energía celular, llamado trifosfato de adenosina.
Bromelina	Enzima proteolítica contenida en la piña, con comprobados efectos terapéuticos.
Catabolismo	Parte del metabolismo en el cual un conjunto de reacciones bioquímicas conducen a la producción de energía utilizable por la célula o el organismo.
Cáucaso	Región natural ubicada entre Europa del este y Asia occidental, entre el mar Negro y el mar Caspio.
Cofactor	Componente no proteico, orgánico o inorgánico, requerido para la actividad biológica de muchas enzimas.
Dextrana	Polisacárido ramificado de gran longitud conformado por unidades de glucosa, utilizado en la industria farmacéutica, fotográfica y agrícola, sintetizado por ciertas bacterias ácido-lácticas a partir de la sacarosa.

Inflorescencia	Flor o grupo de flores dispuestas sobre las ramas o la extremidad del tallo. Las inflorescencias con más de una flor están compuestas por el pedicelo, el eje (parte alargada del tallo que lleva las ramas de las flores), el pedúnculo (parte del tallo que soporta el eje), y las brácteas.
Endospora	Células especializadas muy resistentes, no reproductivas, producidas por unas pocas bacterias para asegurar su supervivencia en ambientes desfavorables.
Enzima	Moléculas biológicas que catalizan reacciones químicas.
Eucariótica	Célula que posee su material hereditario dentro de un núcleo celular definido, gracias a una membrana nuclear.
<i>FDA</i>	Agencia de Alimentos y Drogas de Estados Unidos de América responsable de la regulación de alimentos, suplementos alimenticios, cosméticos, medicamentos, equipos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.
Funcional	Tipo de alimento con características superiores a los alimentos tradicionales para el mantenimiento o mejoramiento de la salud.

GRAS	Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés.
Inóculo	Cantidad de organismos introducidos accidental o voluntariamente en un tejido o medio de cultivo.
Kefiran	Oligosacárido con propiedades prebióticas conformado por glucosa y galactosa en proporción 1:1 presente en la matriz del grano de kéfir o tibico.
Mesófilo	Microorganismo que posee una temperatura óptima de crecimiento entre 20 a 45 °C.
Metabolismo	Conjunto de todas las reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos que se llevan a cabo en una célula y en el organismo.
NAD⁺	Forma reducida de la coenzima llamada nicotinamida adenín dinucleótido, cuya principal función es el intercambio de electrones y protones en la producción de energía de las células.
NADH	Forma oxidada de la coenzima llamada nicotinamina adenín dinucleótido.
Organoléptica	Características de los alimentos u otras sustancias que pueden percibir nuestros sentidos, tales como la vista, el tacto, el gusto y el olfato.

Panela	Es un alimento elaborado a partir de la evaporación del jugo de la caña de azúcar. Se le conoce también como piloncillo o rapadura.
Patógeno	Tipo de organismo que tiene la capacidad de producir enfermedades o daños a la biología del huésped.
Pedúnculo	Parte del tallo que sostiene la inflorescencia o el eje de la inflorescencia.
Prebióticos	Compuestos no digeribles o parcialmente digeribles, principalmente carbohidratos, involucrados en el mejoramiento de la salud del huésped.
Probióticos	Microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped.
Procariótica	Célula sin núcleo celular definido, cuyo material genético está disperso en el citoplasma, en una zona llamada nucleóide.
Simbiosis	Forma de interacción biológica que hace referencia a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies, en la que todos los organismos son beneficiados.

Sorosis

Fruto en el cual todas las flores de la inflorescencia participan en el desarrollo de una estructura que parece un solo fruto, sin embargo está compuesto por muchos frutos individuales o fusionados. En ocasiones participan en su desarrollo otras partes de la flor o el mismo eje de la inflorescencia.

Tibicos

Macrocolonias de bacterias y levaduras dispuestas en una matriz de polisacáridos insolubles, que conforman una asociación simbiótica muy estable.

RESUMEN

El presente estudio consistió en la evaluación a nivel de laboratorio de la capacidad fermentativa de los granos de tibicos, utilizando como sustrato único el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) para ser aprovechado como posible bebida probiótica.

Para esto, se llevó a cabo un conjunto de fermentaciones dentro de un sistema abierto, a temperatura constante de 30 grados Celsius y sin agitación, conteniendo 200 mililitros de sustrato estéril y 3 diferentes proporciones de inóculo, durante un período de 72 horas.

Dicho sustrato fue preparado a partir del corazón de la piña de la variedad Cayena lisa, procedente de los subproductos generados por el procesamiento industrial de esta fruta en Guatemala, mientras que los granos de tibicos fueron adquiridos mediante una familia residente en la ciudad de Guatemala.

Asimismo, se cuantificaron diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos, en función del tiempo de fermentación y de la proporción del inóculo, siendo estos la concentración de la biomasa drenada, la concentración de la biomasa seca, la densidad relativa, la acidez activa, la acidez total titulable, la concentración de bacterias ácido-lácticas y levaduras.

Con base en los resultados obtenidos se estableció que para obtener una posible bebida probiótica, es necesario fermentar de 24 a 72 horas el jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con granos de tibicos en proporción de 0,030 gramos por mililitro, bajo las mismas condiciones experimentales.

OBJETIVOS

General

Evaluar a nivel de laboratorio la capacidad fermentativa de los granos de tибicos, utilizando como sustrato único el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) proveniente de los subproductos de la industria alimenticia, para ser aprovechado como posible bebida probiótica.

Específicos

1. Determinar la concentración de la biomasa drenada en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.
2. Determinar la concentración de la biomasa seca en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.
3. Determinar la densidad relativa del medio fermentado en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.
4. Determinar la acidez activa del medio fermentado en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.
5. Determinar la acidez total titulable del medio fermentado en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.

6. Determinar las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción del inóculo.

HIPÓTESIS

Científica

- Es posible utilizar los granos de tibicos como inóculo para fermentar el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) procedente de los subproductos de la industria alimenticia, para ser aprovechado como una posible bebida probiótica.

Estadística

- Hipótesis nula (H_0):
 - La variación en la proporción de los granos de tibicos inoculados (C_T) no produce un efecto significativo en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).
 - La variación del tiempo de fermentación (θ_F) no produce un efecto significativo en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).

- No existe un efecto significativo de interacción entre las variaciones de la proporción de los granos de tибicos inoculados y las variaciones del tiempo de fermentación ($C_T \cdot \theta_F$), sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).
- Hipótesis alternativa (H_1):
 - La variación en la proporción de los granos de tибicos inoculados (C_T) produce un efecto significativo en una o más de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).
 - La variación del tiempo de fermentación (θ_F) produce un efecto significativo en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).
 - Existe un efecto significativo de interacción entre las variaciones de la variación de los granos de tибicos inoculados y las variaciones en el tiempo de fermentación ($C_T \cdot \theta_F$), sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*).

INTRODUCCIÓN

La piña es una de las frutas tropicales más importantes en la producción mundial, siendo la mayor parte consumida como fruta fresca y el resto comercializada en forma de productos procesados.

Sin embargo, al procesarla industrialmente se generan subproductos que consisten en la corona, tallo, cáscara o recortes, y el corazón o eje de la inflorescencia, representando en total aproximadamente la mitad del peso total de la fruta cosechada.

La mayor parte de estos subproductos no son utilizados en Guatemala y generalmente son depositados en forma inadecuada, ocasionando un incremento en los residuos sólidos.

En la actualidad, debido al rápido crecimiento de la población y al aumento en la demanda de alimentos, los objetivos se basan en reducir al mínimo la cantidad no aprovechada de estos y disminuir los residuos sólidos generados por la industria alimenticia.

Asimismo, no es suficiente elaborar alimentos sanos que simplemente satisfagan al consumidor, sino que se busca elevar la calidad de vida de las personas produciendo alimentos funcionales, los cuales son alimentos modificados que proveen beneficios a la salud superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales.

Por lo tanto, se utilizó el jugo del eje de la inflorescencia de la piña como sustrato y los granos de tiburicos para producir una bebida fermentada con posibles características probióticas, con base en el conocimiento de que a través de las actividades metabólicas de los microorganismos, los alimentos fermentados poseen diversas propiedades de gran valor, pudiendo mencionar las propiedades antimicrobianas, nutricionales, organolépticas, preservantes y funcionales.

Conjuntamente, fue necesario evaluar el proceso de la fermentación entre el sustrato y el inóculo mencionados, para de esta forma utilizar los resultados obtenidos como base para posteriores investigaciones y un posterior escalamiento industrial.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1. Antecedentes

Los alimentos fermentados son, probablemente, de los primeros alimentos consumidos por los seres humanos.

Sin embargo, en Guatemala los granos de tibicos son poco conocidos y poco utilizados por la población, siendo aprovechados únicamente en la elaboración de una bebida fermentada artesanalmente utilizando por lo general panela, conocido también como rapadura o piloncillo, azúcar y/o fruta como materias primas.

Las principales investigaciones realizadas sobre el tema son:

- En septiembre de 2012, en el libro *Probiotic in Animals* de InTech, fue publicada una investigación titulada: *Kefir D'Aqua and Its Probiotic Properties*, realizada por José Mauricio Schneedorf, en el cual describen el origen de los tibicos y la diversidad microbiológica encontrada en diversas muestras. Asimismo prueban la capacidad de resistencia de los granos frente a la exposición de rayos ultravioleta, la administración de antibióticos, tratamiento con gases (oxígeno y ozono) y la competencia frente a un largo espectro de microorganismos. Describe también diversas propiedades en superficies biológicas, así como actividades antibióticas, bacteriostáticas, bactericidas, antiinflamatorias, cicatrizantes, digestivas y antilipidémicas en animales, e interacciones con plantas.

- En 2011, en la revista *International Journal of Food Microbiology*, fue publicada una investigación titulada: *The microbial diversity of water kéfir*, realizada por Anna Gulitz, Jasmin Stadie, Mareike Wenning, Matthias A. Ehrmann y Rudi F. Voguel, en la cual se determina la diversidad microbiológica del kefir de agua mediante los métodos *RAPD-PCR*, secuenciación del ARNr 16S y *FTIR Spectroscopy (Fourier Transform Infrared)*. La bebida fue elaborada de una mezcla de agua, higos secos, una rodaja de limón y azúcar, inoculada con granos de tíficos originarios de tres regiones diferentes e incubadas a 21 grados Celsius durante tres días.

Los análisis indicaron que el número de células viables (células por gramo) de bacterias se encontraban en un rango de $1,2 \times 10^8$ a $5,6 \times 10^8$, y el recuento de células viables de levadura se encontraba en un rango de $5,6 \times 10^6$ a $2,7 \times 10^7$. Se identificaron ocho especies de bacterias diferentes, las cuales fueron *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hordeii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lb. Hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter fabarum* y *Acetobacter orientalis*, y cuatro diferentes levaduras, las cuales fueron *H. valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygorulaspora florentina*. Un total de 57 bacterias ácido lácticas pertenecientes a las especies *Lb. casei*, *Lb. cordeii*, *Lb. nagelii*, *Lb. hilgardii* y *Lc. mesenteroides* fueron capaces de producir exopolisacáridos a partir de la sacarosa.

Finalmente se determinó que las bacterias ácido lácticas representaban el mayor porcentaje del total de bacterias identificadas en un rango del 77,5 al 96,8 por ciento, mientras que las bacterias acéticas se encontraron en un rango del 3,2 al 27,9 por ciento, y la especie de levadura predominante fue la *Z. florentina*.

- En enero de 2011, en la revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology* fue publicada una investigación titulada: *Profile of microbial communities present in tibico (sugary kéfir) grains from different Brazilian States*, realizada por María Gabriela da C. P. Miguel, Patricia G. Cardoso, Karina T. Magalhaes y Rosane F. Schwan, en la cual fueron investigados los microorganismos asociados con los tibicos brasileños procedentes de ocho diferentes regiones del país por métodos convencionales y de secuencia de ADN.

Las bacterias encontrados fueron *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sinkii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kéfir*, *Bacillus cerus*, *Acetobacter lovaniensis* y *Gluconobacter liquefaciens*.

Las levaduras encontradas fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia cecembensis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia caribbica*, *Pichia fermentans*, *Candida valdiviana*, *Zygosaccharomyces fermentati* y *Kazachstania aerobia*.

El 70 por ciento de las especies correspondió a bacterias y el 30 por ciento restante correspondió a las levaduras.

- En enero de 2010, en la revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology* fue publicada una investigación titulada: *Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir*, realizada por Karina Teixeira Magalhaes, G. V. de M. Pereira, Disney Ribeiro Dias y Rosane Freitas Schwan, en la cual fueron investigados los microorganismos asociados con la bebida de kefir de

azúcar brasileño utilizando métodos cultivo-dependientes e independientes.

Como respuesta a los análisis se identificaron un total de 289 bacterias y 129 levaduras mediante métodos fenotípicos y genotípicos. El *Lb. Paracasei* (23,8 por ciento) fue la mayor cepa de bacteria identificada, seguido de *Acetobacter lovaniensis* (16,31 por ciento), *Lactobacillus parabuchneri* (11,71 por ciento), *Lactobacillus kéfir* (10,03 por ciento) y *Lactococcus lactis* (10,03 por ciento). *Saccharomyces cerevisiae* (54,26 por ciento) y *Kluyveromyces lactis* (20,15 por ciento) fueron las especies más comunes de levaduras identificadas.

Asimismo, durante 24 horas de fermentación, la concentración de ácido láctico varió de 0,2 a 1,8 miligramos por mililitro, el ácido acético se incrementó de 0,08 a 1,12 miligramos por mililitro, y el etanol alcanzó un valor final de 1,24 miligramos por mililitro.

- En 2005 Rubén Darío Moreno Terrazas Casildo realizó una tesis doctoral titulada: Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache, en la Universidad Autónoma Metropolitana en México. Para dicho estudio se utilizaron muestras de la bebida, proporcionadas a las 48 horas y 60 horas de fermentación, de establecimientos comerciales de la ciudad de México en donde se prepara artesanalmente el tepache utilizando agua azúcar, cáscara de piña, naranja, tamarindo, tibicos y los dejan fermentar en barriles de madera.

Se determinó la presencia de ácido láctico, ácido acético, etanol y compuestos volátiles mediante cromatografía HPLC y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En promedio, el etanol se encontró en cantidades menores al 1 por ciento, el ácido láctico fue menor al 0,4 por ciento y el ácido acético fue menor a 0,04 por ciento. Asimismo se determinó que los microorganismos más abundantes fueron las bacterias lácticas, las bacterias acéticas y las levaduras en niveles mayores a 10^6 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro en el producto.

- En 1993, en la Revista Latinoamericana de Microbiología, fue publicada una investigación titulada: Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos, realizada por Rubio, Lappe, Wachter y Ulloa, en la cual se realizaron muestreos durante diferentes tiempos de fermentación para aislar e identificar los microorganismos involucrados en la fermentación así como su variación durante todo el proceso, para cuantificar algunos productos y para correlacionar los cambios microbianos con los bioquímicos durante la fermentación.

Los análisis microbiológicos indicaron que las bacterias lácticas alcanzaron la máxima población a las 24 horas, mientras que levaduras alcanzaron su valor máximo a las 96 horas. Los estudios bioquímicos indicaron que el pH disminuyó drásticamente a un valor de 3,4 en las primeras 24 horas, hasta estabilizarse posteriormente a un valor de 3,0.

Asimismo se observó un decremento en la concentración de carbohidratos totales coincidiendo con el período en el que los grupos microbianos se encontraban en desarrollo, un aumento en la

concentración de carbohidratos reductores y posteriormente una disminución indicando la hidrólisis de la sacarosa y el consumo de los monosacáridos.

- En 1988, en la Revista Latinoamericana de Microbiología, fue publicada una investigación titulada: Determinación de algunos parámetros para la producción doméstica de tibicos, realizada por Joaquín Díaz Garcés, Víctor Díaz Garcés, Miguel Ulloa y Javier Taboada, en la cual se determinaron las mejores condiciones de cultivo de los tibicos en forma doméstica mediante piloncillo, melaza, melado, mascabado, azúcar morena, azúcar blanca, jugo de betadel, jugo de tuna y piña, utilizando diferentes concentraciones, temperaturas y tiempos de incubación.

Se obtuvo que la mayor producción fue alcanzada con 50 gramos de piloncillo en el medio de cultivo, 29 grados Celsius y 72 horas de incubación, y la mayor productividad de biomasa (1,9 gramos por hora) se obtuvo en el mismo medio a las 24 horas.

Por su parte, el presente trabajo evaluó a nivel de laboratorio la capacidad fermentativa de los granos de tibicos, utilizando como único sustrato el jugo del eje de la inflorescencia (corazón) de la piña proveniente de los subproductos originados por la industria alimenticia, y con base en los antecedentes mencionados, es el primer proyecto de investigación que relaciona el sustrato e inóculo indicados en un proceso fermentativo.

1.2. Justificación

En el 2010 Guatemala se posicionó en el puesto número dieciocho de la producción mundial de piña con un valor de 207 800 toneladas métricas. Parte de la cual es procesada industrialmente para ser comercializada dentro y fuera del país.

Sin embargo, en Guatemala el procesamiento de dicha fruta a nivel industrial genera diversos desechos que consisten en la piel o recortes, el corazón o eje de la inflorescencia, el tallo y la corona, los cuales no son utilizados y generalmente son depositados en forma inadecuada ocasionando un incremento en los residuos sólidos, principalmente alrededor de las plantas de procesamiento.

Debido a la necesidad de reducir y aprovechar los residuos sólidos, así como a la búsqueda de elaborar alimentos que provean beneficios superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales, surgió la necesidad de un proceso en el cual se pudieran obtener dichos objetivos.

La opción adoptada fue utilizar el eje de la inflorescencia piña, aprovechando su contenido nutricional, como sustrato único para elaborar una bebida fermentada, y posiblemente probiótica, utilizando los granos de tибicos como inóculo.

Debido a que no existen datos de un procedimiento igual al mencionado, fue necesario evaluar los parámetros de fermentación a nivel de laboratorio, para poder utilizar los resultados obtenidos como base para futuras investigaciones y un posterior escalamiento industrial.

1.3. Determinación del problema

Como punto de partida para el desarrollo del presente trabajo de investigación, fue necesario identificar en forma precisa el objeto de estudio, es decir, la problemática a solucionar.

1.3.1. Definición

¿Es posible utilizar los granos de tибicos como inóculo para fermentar el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) proveniente de los subproductos de la industria alimenticia, para ser aprovechado como una posible bebida probiótica?

1.3.2. Alcances y límites del problema

Los alcances y límites del problema determinan hasta qué punto será desarrollado el objeto de estudio, qué tanto se pretende abarcar y qué se dejará sin examinar en la investigación, es decir, establecen las fronteras del trabajo.

1.3.2.1. Alcances

La evaluación de la capacidad fermentativa se llevó a cabo utilizando el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) de la variedad Cayena lisa, proveniente de los residuos generados por el procesamiento industrial de esta fruta en nuestro país, así como granos de tибicos procedentes de una residencia particular de la ciudad de Guatemala.

Los parámetros físicos, químicos y microbiológicos cuantificados en función de la proporción del inóculo y el tiempo de fermentación fueron la

concentración de la biomasa drenada y la concentración de la biomasa seca, en los granos de tибicos; mientras que en el medio fermentado los parámetros cuantificados fueron la densidad relativa, la acidez activa, la acidez total titulable, la concentración de bacterias ácido-lácticas y la concentración de levaduras.

1.3.2.2. Límites

Las principales limitaciones con las que se contó fueron los recursos materiales y económicos.

Respecto a los recursos materiales, el espacio físico, los equipos y la mayor parte de la cristalería son utilizados para docencia por la Escuela de Ingeniería Química y para diversos análisis por el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos de la sección de Química Industrial del Centro de Investigaciones de Ingeniería, por lo que fue necesario coordinar su uso para no interferir con otros procedimientos.

En cuanto a los recursos económicos, debido a la ausencia de equipos y reactivos para análisis específicos, éstos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, representando un costo adicional.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Piña

La materia prima utilizada para el desarrollo del presente trabajo de investigación, procede del fruto de la piña, por lo que es necesario realizar una descripción detallada de dicha fruta.

2.1.1. Origen

Mucho tiempo antes de la llegada de Cristóbal Colón, los nativos americanos habían domesticado y distribuido la piña ampliamente por el continente americano y el Caribe, y utilizaban la fruta para preparar bebidas alcohólicas, como fuente de fibras y para usos medicinales.

Se cree que la piña es originaria del centro y sureste de Brasil, y al noreste de Argentina y Paraguay, aunque también se considera a la región de la Guyana como centro de origen. A pesar de que posee una distribución natural confinada al continente suramericano, actualmente se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales cálidas del mundo.

2.1.2. Características

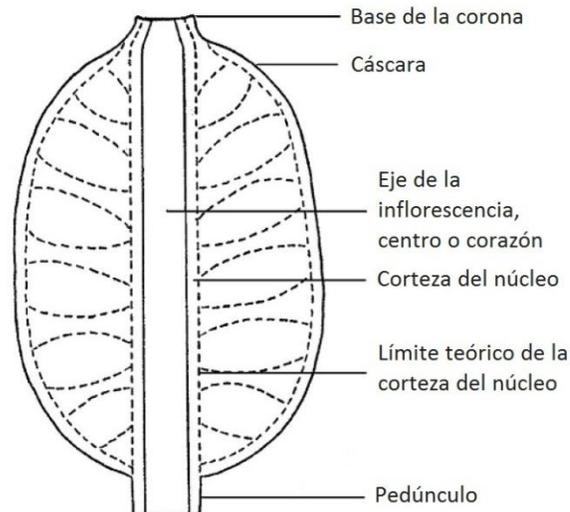
La piña pertenece a la familia de las Bromeliáceas, al género Ananás y especie *Ananas comosus*. Es una planta herbácea perenne, que puede alcanzar hasta 2 metros de altura y 1,5 metros de diámetro, de tallo corto y

grueso, y de hojas acanaladas, angostas, con márgenes generalmente espinosos y aserrados, aunque estos también pueden ser lisos.

Después de su fructificación continúa su crecimiento mediante una o más yemas auxiliares, que dan origen a ramas que se desarrollan y producen un nuevo fruto.

La planta produce de 50 a 200 flores auto estériles que se encuentran en su inflorescencia o espiga. Cuando no se produce una polinización cruzada o fecundación, cada flor da origen a un pequeño fruto. La fusión de estos frutos y del eje de la inflorescencia, conforman el fruto múltiple conocido en la botánica como sorosis, y comúnmente como fruto de la piña, en un proceso que dura entre 5 y 6 meses.

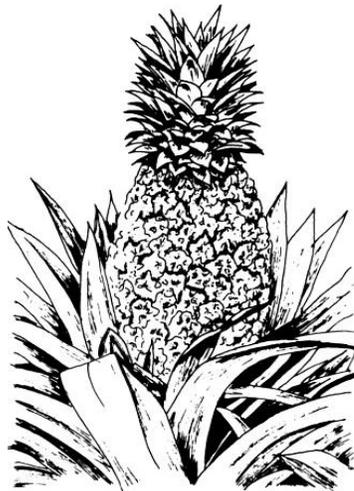
Figura 1. **Morfología del fruto de la piña de la variedad Cayena lisa**



Fuente: *The pineapple, botany, production and uses*. Bartholomew, Duane Phillip; PAULL, Robert E.; ROHRBACH, Kenneth G. (eds.). p. 19.

Los frutos suelen ser voluminosos, jugosos, aromáticos, de sabor agridulce, y de forma cilíndrica, con un peso que oscila entre 0,5 - 4 kilogramos, y una corona en la parte superior compuesta de hojas pequeñas en un pequeño tallo, como se puede observar en la figura 2.

Figura 2. **Fruto de la piña**



Fuente: GUIDO, Maritza; et al. *La piña*. p. 6.

2.1.3. Contenido nutricional

El contenido nutricional del fruto de la piña no es constante en cada una de las especies, sino que varía según la especie a la cual pertenezca y según el grado de madurez.

Sin embargo, en términos generales puede decirse que posee un alto contenido de fibra dietética, principalmente gomas y pectinas solubles, es un alimento bajo en sodio, buena fuente de potasio y de vitamina C.

El fruto contiene además bromelina, la cual es una enzima proteolítica similar a la papaína, con diferentes propiedades biológicas.

Debido al contenido nutricional, la piña es una fruta adecuada para los procesos fermentativos.

Tabla I. **Información nutricional promedio de las variedades tradicionales de piña**

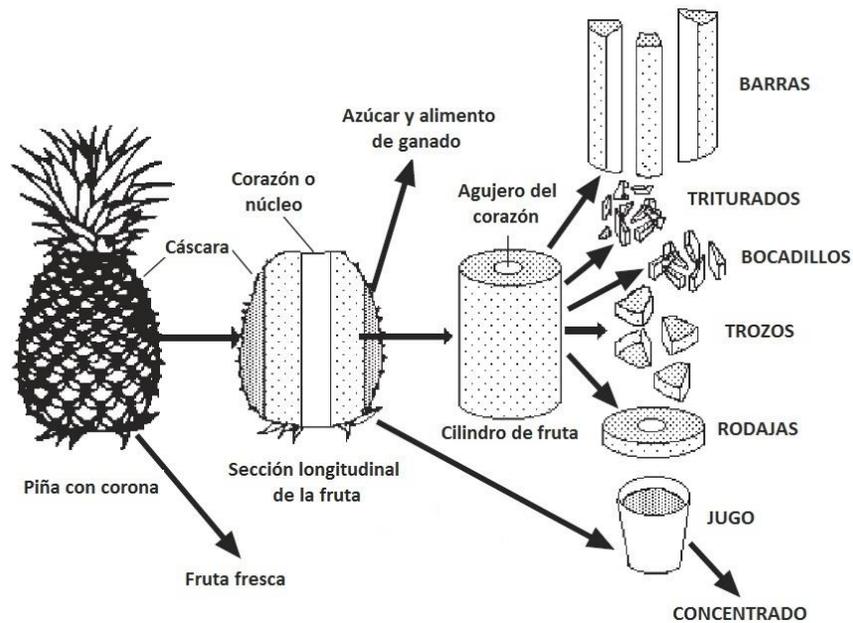
Cantidades por cada 100 g de fruta			
Nutriente	Valor	Nutriente	Valor
Energía	50,00 kcal	Niacina	0,50 mg
Carbohidratos (diferencia)	13,12 g	Riboflavina	0,032 mg
Sacarosa	5,99 g	Tiamina	0,079 mg
Glucosa	1,73 g	Minerales	
Fructosa	2,12 g	Calcio	13,00 mg
Grasa total	0,12 g	Hierro	0,29 mg
Proteína	0,54 g	Magnesio	12,00 mg
Vitaminas		Fósforo	8,00 mg
Vitamina A	58,00 UI	Potasio	109,00 mg
Vitamina B6	0,112 mg	Sodio	1,00 mg
Vitamina C	47,80 mg	Zinc	0,12 mg
Vitamina E	0,02 mg	Cobre	0,11 mg
Vitamina K	0,70 µg	Manganeso	0,927 mg
Ácido pantoténico	0,213 mg	Selenio	0,10 µg
Colina	5,50 mg	Agua	86,00 g
Folato	18,00 µg	Fibra total dietética	1,40 g

Fuente: ndb.nal.usda.gov. Consulta: 07 de marzo de 2012.

2.1.4. Utilización

La piña es una de las frutas tropicales más importantes en la producción mundial. Su comercio internacional consiste principalmente en productos procesados como jugos, concentrados o pulpas, y como barras, trozos o rodajas de piña, ya sean enlatadas, deshidratadas, refrigeradas o congeladas.

Figura 3. **Productos de la piña**



Fuente: *The pineapple, botany, production and uses*. Bartholomew, Duane Phillip; PAULL, Robert E.; ROHRBACH, Kenneth G. (eds.). p. 4.

Sin embargo, a pesar del significado comercial de la fruta procesada, la mayor parte de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca en el lugar de origen.

2.1.5. Subproductos

Cuando la piña es procesada industrialmente se generan diversos desechos que consisten en la cáscara (29 - 40 por ciento), la corona (2 - 4 por ciento), el corazón o eje de la inflorescencia (9 - 10 por ciento) y el pedúnculo (2 - 5 por ciento), los cuales pueden constituir hasta un 59 por ciento del peso de la fruta. Además, los sólidos centrifugados provenientes de la elaboración de jugos también pueden ser descartados según las características del producto final.

Algunas veces estos subproductos son utilizados para diversos objetivos como la extracción de bromelina, extracción de ácido cítrico, elaboración de vinagre, como alimento para animales, y para la extracción de fibras.

Uno de los desechos que no es utilizado por las industrias de nuestro país es el corazón o núcleo, el cual además de ser desaprovechado, muchas veces es depositado de manera incorrecta generando un incremento de los desechos sólidos en los alrededores de las plantas de procesamiento.

2.1.6. Producción nacional

Según las cifras no oficiales de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en el 2011 Guatemala se posicionó en el puesto número diecisiete de la producción mundial de piña, con una producción de 234 560 toneladas métricas. Asimismo, indica que en el mismo año este fruto ocupó la posición número diez de la producción agrícola de dicho país.

Según los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) de Guatemala, las cifras preliminares de la producción de piña de nuestro país en el 2010 fue de 234 325,82 toneladas métricas, en donde los departamentos de Guatemala, Izabal y Escuintla fueron los mayores productores según el Censo Nacional Agropecuario de 2003. De este valor, 10 661,28 toneladas métricas fueron exportadas, además 58,10 toneladas métricas fueron importadas, en su mayoría de Estados Unidos de Norteamérica.

2.2. Tibicos

El proceso de transformación bioquímico del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, se llevó a cabo biológicamente a través del uso de granos de tibicos, siendo indispensable su descripción detallada.

2.2.1. Origen

Según la historia, estos granos surgen como una adaptación de los granos de kéfir cultivados en leche, los cuales fueron considerados como un regalo de Alá hacia el pueblo musulmán de las montañas al norte del Cáucaso, una región entre Europa del Este y Asia occidental, quienes lo han ido pasando de generación en generación, y cuyo nombre original significa buena sensación, procedente de la palabra turca *keif*, debido a su sensación después de beberlo o debido a sus propiedades saludables.

Estos granos cultivados en soluciones de agua y azúcar son conocidos como kéfir de agua, kéfir de azúcar o tibicos, y poseen muchas similitudes a los granos de kéfir en términos de su estructura, diversidad microbiológica y los productos formados durante el proceso de fermentación.

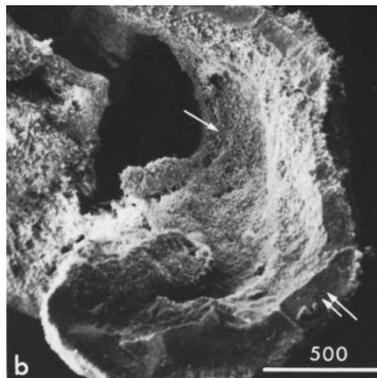
Algunos autores indican que crecen sobre las hojas de diversas especies de cactus del género *Opuntia*, y que son originarios de México, con los cuales se elabora una bebida conocida popularmente como tepache. Otros presumen que provengan de Japón.

Se dice también que fueron traídos a América del Tíbet por la Madre Teresa de Calcuta con el deseo de ayudar a las personas.

2.2.2. Características

Los granos de tibicos son macrocolonias de microorganismos que consisten en masas compactas y gelatinosas de color blanquecino, translúcidos, de forma irregular y de tamaño variable.

Figura 4. **Estructura interna y externa de un grano de tibico fracturado**

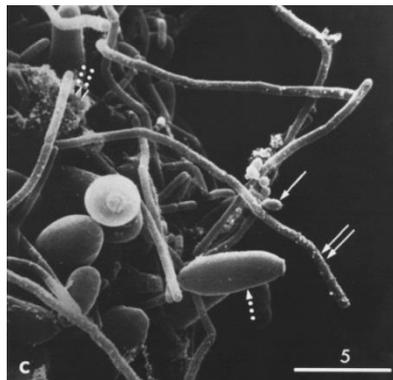


Fuente: MOINAS, Marielise; HORISBERGER, Marck; BAUER, Heinz. *The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy*. p. 158.

Están compuestos principalmente por agua y una matriz de polisacáridos (dextrana y kefirán) dispuestos en una capa externa compacta y una estructura interna esponjosa, visible en la figura 4 mediante una flecha simple y doble respectivamente, en donde se encuentran diversas bacterias y levaduras que constituyen una asociación simbiótica muy estable.

El diámetro máximo de estos granos es de 8 a 10 milímetros, y en su estructura la capa externa se encuentra más densamente poblada por los microorganismos que la estructura interna, debido a la presencia de gas.

Figura 5. **Capa externa de un grano de tibiico presentando bacterias y levaduras**



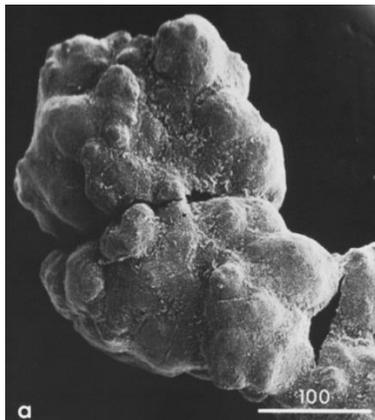
Fuente: MOINAS, Marielise; HORISBERGER, Marck; BAUER, Heinz. *The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy*. p. 158.

Cuando los microorganismos encuentran un medio adecuado, los granos aumentan su tamaño y son divididos mecánicamente por el aumento de presión de dióxido de carbono de su interior (figura 6). Asimismo, los microorganismos suspendidos en el medio también pueden constituir granos al formar pequeñas agrupaciones y generar su propia matriz de polisacáridos.

La matriz de polisacáridos que conforma los granos provee una elevada protección a los microorganismos que se encuentran dentro de él hacia cambios físicos y químicos bruscos, en comparación a los organismos que se encuentran en la superficie o suspendidos en el medio.

Generalmente, los granos de tибicos son inoculados en una solución basada en sacarosa, pudiendo contener frutas o extractos de frutas, en una proporción del 3 al 10 por ciento, produciendo una bebida artesanal auto carbonatada, de sabor ácido y de bajo contenido alcohólico mediante la fermentación de la sacarosa a temperatura ambiente, cuando el período de fermentación es corto, pero cuando se prolonga más se transforma en una bebida alcohólica y posteriormente en vinagre.

Figura 6. **Proceso de fisión de un grano de tибico**



Fuente: MOINAS, Marielise; HORISBERGER, Marck; BAUER, Heinz. *The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy*. p. 158.

Después de un período, que depende según el criterio y gusto de la persona que lo elabora, el líquido es decantado y utilizado como bebida, los granos son lavados con agua potable, y reutilizados para una futura fermentación en un medio fresco.

En Guatemala, para elaborar el medio de fermentación artesanal generalmente se utiliza panela, azúcar blanca o morena, y diversas frutas como sustrato, ya sean en forma específica o como una combinación entre ellos, en diferentes proporciones.

Los microorganismos en suspensión, los granos y los polisacáridos que conforman la matriz de los tibicos poseen diversas características positivas hacia la salud comprobadas científicamente, pudiendo mencionar efectos bacteriostáticos, bactericidas, antibióticos, cicatrizantes, antiinflamatorios, antilipidémicos, digestivos y antitrombóticos.

Asimismo, poseen una gran resistencia a los microorganismos patógenos o foráneos, pudiendo preparar esta bebida bajo condiciones no estériles con un riesgo muy bajo de contaminación.

Otra característica de estas macrocolonias es que se pueden realizar fermentaciones regulares durante un largo período de tiempo sin que se modifiquen las proporciones de los microorganismos que la componen, mientras las condiciones del cultivo permanezcan iguales.

2.2.3. Nombres comunes

Tibicos no es el único nombre con el que se les denomina a estas comunidades de microorganismos simbióticos alrededor del mundo.

Otras denominaciones populares son: tibi, hongo chino, marinos, kéfir azucarado (*sugary kefir*), kéfir de agua (*water kefir*), cristales japoneses (*Japanese crystals*) o cristales de agua japoneses (*Japanese water crystals*), y plantas de cerveza de jengibre (*Gingerbeer plant*).

2.2.4. Microorganismos presentes

A través de los años se han realizado diversos estudios por medio de métodos cultivo-dependientes y métodos moleculares para determinar las especies y proporciones de microorganismos que se encuentran presentes en los tibicos de diversas regiones geográficas.

Sin embargo, los resultados obtenidos varían según la zona geográfica de donde procedan. Además estas macrocolonias son capaces de modificar la proporción de bacterias y levaduras, así como las especies según el tiempo de fermentación, condiciones experimentales, temperatura, y los microorganismos circundantes.

En términos generales la microbiota de los tibicos está constituida principalmente por bacterias ácido-lácticas, homofermentativas y heterofermentativas, las cuales están presentes en la mayor proporción, seguidas por levaduras y finalmente por algunas bacterias ácido-acéticas, conformando una asociación simbiótica muy estable.

A pesar de la gran diversidad de microorganismos encontrada en diferentes muestras de tibicos como se puede observar en la Tabla II, existen géneros comunes tales como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y *Acetobacter*.

Tabla II. **Algunas cepas encontradas en muestras de tibicos**

Bacterias	
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Lactobacillus hordei</i>
<i>Acetobacter fabarum</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>
<i>Acetobacter orientalis</i>	<i>Lactobacillus keranofaciens</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>
<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Lactobacillus nagelii</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Gluconobacter liquefaciens</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus satsumensis</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus sunkii</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subs. <i>casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
Levaduras	
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Lanchancea fermentati</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Pichia caribbica</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Pichia cecembensis</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Candida lambica</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Candida magnoliae</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>Candida valida</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Saccharomyces florentinus</i>
<i>Hanseniaspora vinarum</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Hanseniaspora yalbensis</i>	<i>Toruspola delbruechii</i>
<i>Kazachstania aerobia</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Zygorulasporea florentina</i>

Fuente: SCHNEEDORF, José Mauricio. "Kefir d'aqua and its probiotic properties". En: *Probiotic in animals*. Rigobelo, Everlon Cid. p. 56.

Se ha encontrado además cepas de la bacteria patógena *Enterobacter aerogenes*, cuya población disminuye al transcurrir la fermentación. Sin embargo se ha asociado a las malas prácticas higiénicas en la elaboración de la bebida o a las malas prácticas higiénicas al momento de elaborar los ingredientes utilizados como sustratos.

2.3. Fermentación

La palabra fermentación proviene del latín *fermentare* que significa ebullición, debido al hecho de que en el inicio de la fermentación del vino se liberan burbujas continuamente.

A través del tiempo este concepto se ha ido modificando abarcando diversos aspectos, sin embargo existen dos criterios importantes para su definición.

En términos bioquímicos, la fermentación es el proceso de obtención de energía a través de una serie de oxidaciones y reducciones de un sustrato orgánico, utilizando moléculas orgánicas como aceptores finales de electrones (cuando el producto se encuentra más oxidado que el sustrato), o como aceptores de los equivalentes reductores (cuando el producto se encuentra más reducido que el sustrato).

Es importante mencionar que en este concepto cuando un compuesto inorgánico es el aceptor final, el proceso se considera como respiración. Además la respiración se considera aeróbica cuando el oxígeno es el aceptor final, y anaeróbica cuando es algún otro compuesto inorgánico, como el sulfato o nitrato.

En términos de la microbiología industrial, la fermentación es cualquier proceso en el que se obtiene biomasa o metabolitos deseados mediante el uso premeditado de microorganismos, a partir de sustancias orgánicas, sin importar si el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico o inorgánico.

2.3.1. Catabolismo de los carbohidratos

Para comprender mejor el proceso de fermentación, es necesario conocer los eventos metabólicos por medio de los cuales los microorganismos obtienen energía al transformar las moléculas hacia compuestos más sencillos.

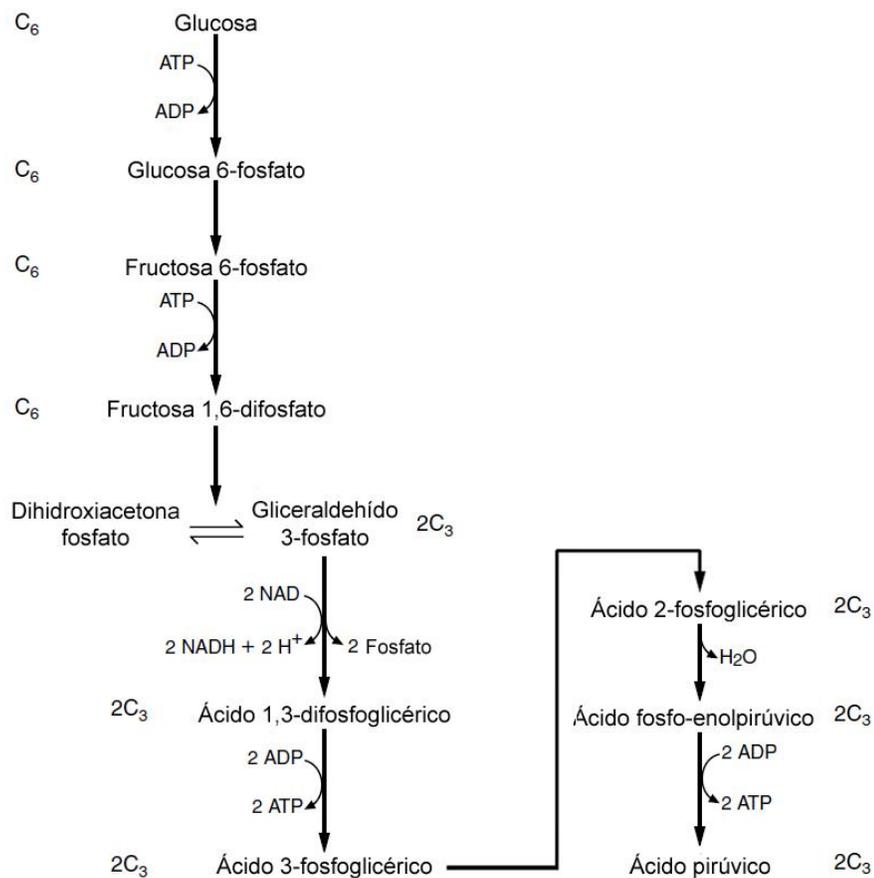
Al considerar a los microorganismos que utilizan los azúcares como la principal fuente de carbono y energía, se pueden mencionar cuatro vías para el catabolismo de los carbohidratos: la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (nombrada clásicamente como glucólisis), la ruta Pentosa-Fosfato, la ruta Entner-Duodoroff, y la ruta Fosfocetolasa.

La ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) representa la principal ruta y la más conocida (figura 7), la cual puede dividirse en dos pasos. En el primero, la molécula de glucosa atraviesa una fase preparatoria en donde finalmente son formadas dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. En la segunda fase se forma como producto final el piruvato.

Por cada molécula de glucosa, dos moléculas de ATP son consumidas en la fase preparatoria y cuatro son producidas en la fase posterior, dando como resultado un rendimiento de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa transformada en piruvato.

Esta ruta puede llevarse a cabo bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Bajo condiciones aeróbicas el piruvato puede ser oxidado hacia CO_2 y H_2O mediante ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), mientras que bajo condiciones anaeróbicas el piruvato es metabolizado hacia un amplio rango de productos.

Figura 7. **Ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)**

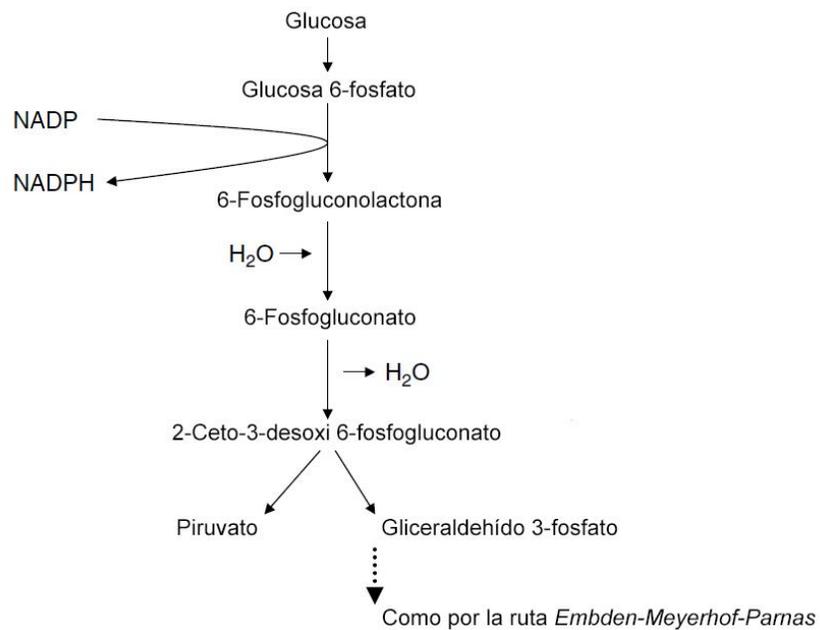


Fuente: BAMFORTH, Charles W. *Food, fermentation and micro-organisms*. p. 20.

La ruta Pentosa-Fosfato (*PP*), conocida también como ruta Fosfogluconato y como ruta Hexosa Monofosfato (*HMP*), se divide en dos partes. La primera es la fase oxidativa a través de la cual se obtiene energía, y la segunda es la fase no oxidativa a través de la cual se generan pentosas para la posterior síntesis de nucleótidos.

La ruta Entner-Duodoroff (figura 8) describe una serie alterna de reacciones que catabolizan la glucosa a piruvato, la cual es utilizada por pocas bacterias y algunos fungi. Algunos microorganismos utilizan esta ruta para la descomposición anaeróbica de la glucosa, y otros únicamente la utilizan en el metabolismo del gluconato.

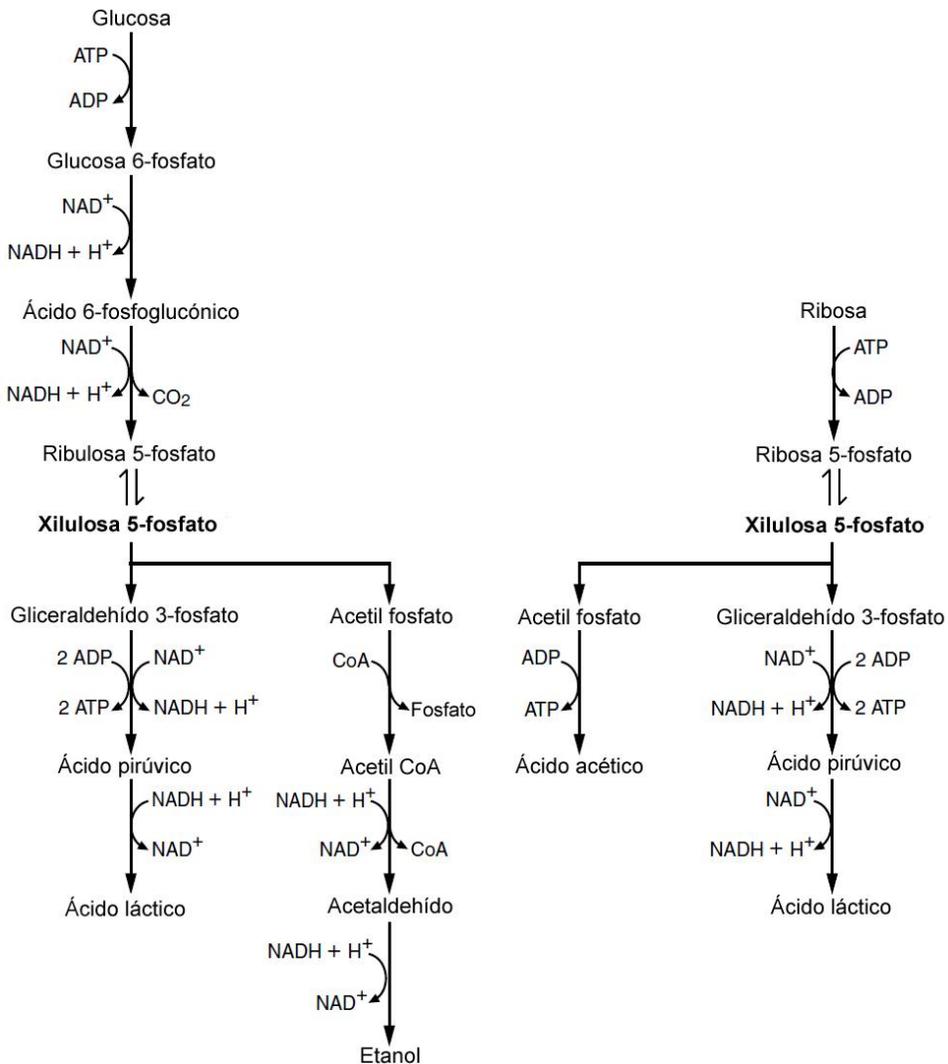
Figura 8. **Ruta Entner-Duodoroff (ED)**



Fuente: BAMFORTH, Charles W. *Food, fermentation and micro-organisms*. p. 22.

Por último, la ruta de la Fosfoacetolasa (figura 9), conocida también como la ruta heteroláctica, es utilizada principalmente por las bacterias ácido-lácticas heterofermentativas (heterolácticas), generando como subproductos ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. De igual forma, a través de esta ruta las pentosas son fermentadas en ácido láctico y ácido acético.

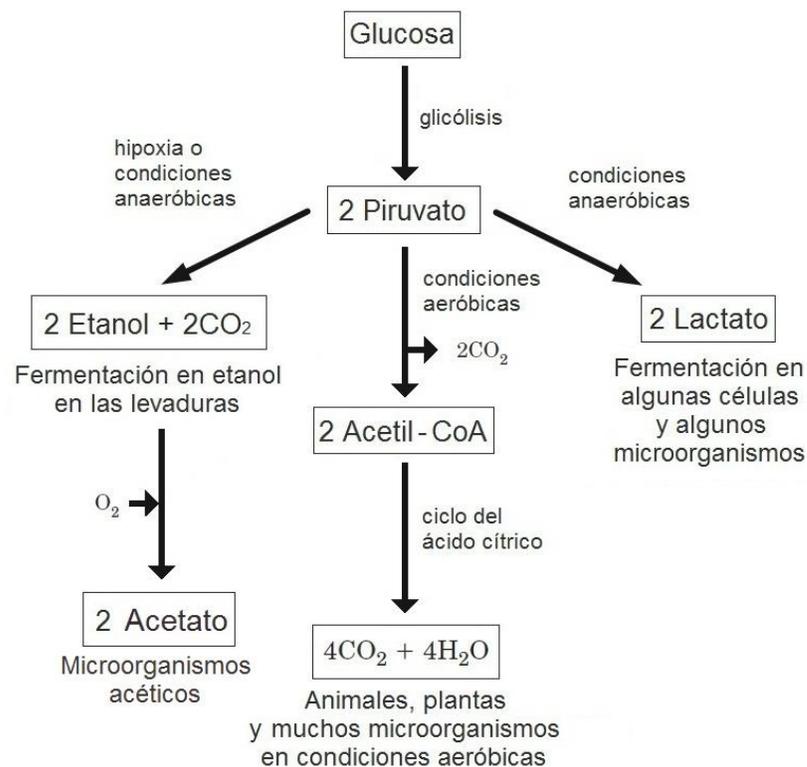
Figura 9. Ruta Fosfoacetolasa (ruta heteroláctica)



Fuente: BAMFORTH, Charles W. *Food, fermentation and micro-organisms*. p. 22.

Con la excepción de algunas interesantes variaciones en el reino de los microorganismos, el piruvato formado por el catabolismo de los carbohidratos es metabolizado posteriormente por tres principales vías: en condiciones anaeróbicas se produce ácido láctico y etanol, mientras que en condiciones aeróbicas piruvato es desviado hacia el ciclo de Krebs y el etanol es transformado en ácido acético.

Figura 10. Principales destinos del piruvato



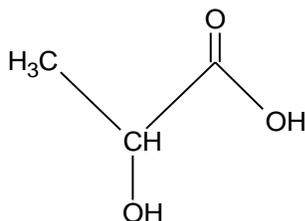
Fuente: NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principles of biochemistry*. p. 525.

2.3.2. Fermentación láctica

El ácido láctico, conocido también como ácido 2-hidroxipropiónico, es un ácido orgánico de tres carbonos, peso molecular de 90,08 gramos por mol, y pKa de 3,86.

Se encuentra clasificado por la FDA como Generalmente Reconocido como Seguro (*GRAS*, por sus siglas en inglés), y es ampliamente utilizado en los alimentos como agente acidulante, saborizante, y preservante.

Figura 11. Estructura del ácido láctico



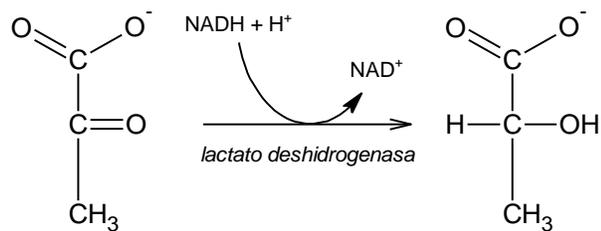
Fuente: THERON, Maria M.; RYKERS LUES, J. F. *Organic acids and food preservation*; p. 25.

Dicho compuesto existe naturalmente como dos isómeros ópticos: D(-)-ácido láctico y L(+)-ácido láctico. Siendo la forma L(+) la preferida para las aplicaciones alimenticias, además de ser esta la forma en la que el ser humano metaboliza el ácido láctico por medio de la enzima L-lactato deshidrogenasa.

Este ácido no forma parte de los alimentos naturalmente, sino que es generado por medio de la fermentación de las bacterias ácido-lácticas, las cuales se clasifican según la cantidad de ácido láctico producido como: homofermentativas u homolácticas, heterofermentativas o heterolácticas, y homofermentativas facultativas.

Durante la fermentación homoláctica, el ácido láctico producido a partir de la reducción del piruvato, constituye más del 85 por ciento de los productos finales.

Figura 12. **Reducción del piruvato a lactato**



Fuente: NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principles of biochemistry*. p. 538.

Sin embargo, durante la fermentación heteroláctica, el ácido láctico producido constituye aproximadamente el 50 por ciento de los productos finales, mientras que el resto es conformado en su mayoría por etanol y dióxido de carbono.

La fermentación heteroláctica se presenta a través de la ruta catabólica de la fosfoacetolasa, en la cual durante la fermentación de la glucosa se produce ácido láctico, etanol y dióxido de carbono; así como también puede presentarse a través de la fermentación de la ribosa, en la cual se produce ácido láctico ácido acético.

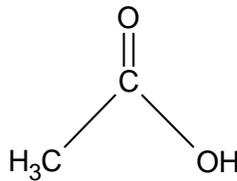
Además, las bacterias ácido-lácticas pueden generar otros productos finales alternativos diferentes a los mencionados bajo condiciones especiales.

2.3.3. Fermentación acética

El ácido acético es un ácido monocarboxílico, de fórmula CH_3COOH , peso molecular de 60,052 gramos por mol, y pKa de 4,76.

Se encuentra clasificado por la FDA como GRAS y es aprobada su utilización alrededor del mundo como aditivo alimenticio y como preservante.

Figura 13. Estructura del ácido acético



Fuente: THERON, Maria M.; RYKERS LUES, J. F. *Organic acids and food preservation*; p. 33.

Este compuesto es secretado principalmente por las bacterias ácido-acéticas a través de un proceso bioquímico estrictamente aeróbico en el que el etanol es oxidado en ácido acético.

Figura 14. Oxidación del etanol a ácido acético

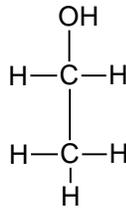


Fuente: OKAFOR, Nduka. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. p. 283.

2.3.4. Fermentación alcohólica

El etanol, conocido también como alcohol etílico o simplemente como alcohol, es un alcohol de fórmula C_2H_6O y peso molecular de 46,07 gramos por mol, el cual está clasificado por la FDA como *GRAS*.

Figura 15. Estructura del etanol



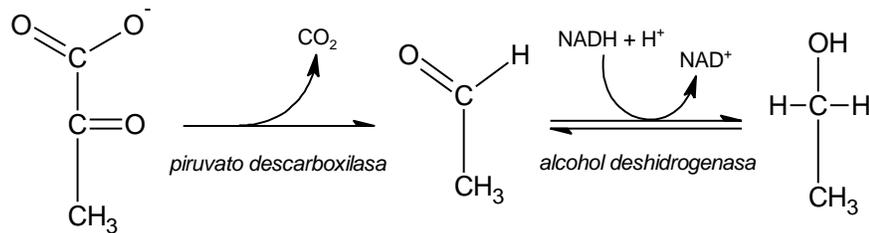
Fuente: NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principles of biochemistry*. p. 509.

Algunos microorganismos, principalmente levaduras y mohos, producen etanol y dióxido de carbono a partir del procesamiento de los carbohidratos en un proceso metabólico anaeróbico, conocido como fermentación alcohólica o etanólica.

Durante este proceso, la glucosa es convertida a piruvato por medio de la glucólisis, y el piruvato es convertido a etanol y dióxido de carbono en un proceso de dos pasos.

En el primer paso el piruvato es descarboxilado a acetaldehído en una reacción irreversible catalizada por el piruvato descarboxilasa. En el segundo paso, el acetaldehído es reducido a etanol a través de la acción del alcohol deshidrogenasa y de la capacidad reductora del NADH.

Figura 16. **Transformación del piruvato a etanol**



Fuente: NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principles of biochemistry*. p. 538.

2.3.5. **Uso como método de preservación**

Los alimentos son derivados de otros organismos vivos y durante su desarrollo y preparación son expuestos continuamente a la contaminación microbiológica.

La contaminación resultante puede tener diferentes efectos en el alimento. Estos incluyen efectos negativos como el deterioro, cuando el alimento se transforma en no apto para el consumo humano, o riesgos a la salud cuando se encuentran presentes microorganismos tóxicos o infecciosos.

Para reducir o prevenir estos efectos negativos, pueden aplicarse cuatro principios básicos:

- Minimizar el nivel de la contaminación microbiana en el alimento.
- Inhibir el crecimiento de los microorganismos contaminantes.
- Eliminar a los microorganismos contaminantes.
- Remover a los microorganismos contaminantes.

De estos principios, la fermentación utiliza una combinación de los primeros 3.

La preservación por fermentación se basa en que los microorganismos pueden mejorar su propia competitividad mediante la transformación de su ambiente, de tal manera que este se convierte en letal o inhibitorio para otros organismos, mientras estimulan su propio desarrollo.

No se espera que este proceso esterilice las materias primas, sino que se deben utilizar sustratos de alta calidad.

La fermentación mejora la seguridad de los alimentos disminuyendo el riesgo de que los microorganismos patógenos y las toxinas alcancen niveles infecciosos o tóxicos, respectivamente, y extiende la vida de anaquel por medio de la inhibición del crecimiento de microorganismos deteriorantes.

2.4. Alimentos fermentados

Los alimentos fermentados son aquellos alimentos que han sido sometidos a la acción de microorganismos, modificando las propiedades sensoriales y funcionales debido a sus procesos bioquímicos, produciendo un producto final deseable por el consumidor.

Muy probablemente estos tipos de alimentos fueron los primeros en ser consumidos por los seres humanos, no porque hayan pretendido preparar un alimento fermentado en particular, sino porque era el resultado inevitable de cuando los alimentos se quedaban sin conservar.

La primera fermentación debe haberse iniciado probablemente con el almacenamiento del excedente de la leche, que resultaba en un producto fermentado al siguiente día.

Después del secado, la fermentación es el método de preservación de alimentos más antiguo. Por ejemplo, hace 3 000 a 4 000 años antes de Cristo, el pan y la cerveza eran producidos en masa por las panaderías egipcias y las cervecerías babilónicas.

Estos alimentos se hicieron populares con el nacimiento de la civilización ya que no solamente se preservaba la comida, sino que además producía una gran variedad de sabores, formas y otras características sensoriales.

También se hicieron importantes para los ejércitos y navíos debido a que estos alimentos tenían una mayor estabilidad al almacenarlos. Por ejemplo, el vino y la cerveza eran preferidos sobre el agua debido a que ésta última se contaminaba mucho con materia fecal u otros materiales.

2.4.1. Microorganismos importantes

Durante la fermentación de los alimentos, los microorganismos son los encargados de transformar los constituyentes químicos de las materias primas.

Los principales grupos de microorganismos utilizados en la elaboración de alimentos fermentados son las bacterias ácido-lácticas, las bacterias ácido-acéticas, y las levaduras.

2.4.1.1. Bacterias ácido-lácticas

Estas bacterias son definidas generalmente como un grupo productoras de ácido láctico, no son formadoras de esporas, son catalasa-negativa, no son móviles, son Gram-positivas, son anaerobias facultativas, son ácido tolerantes, y se les ha conferido el estado de *GRAS* en los alimentos, aunque algunas cepas son patogénicas.

La mayor parte de estos microorganismos son mesófilos, pero algunos pueden crecer a temperatura de refrigeración (4 grados Celsius) y a temperatura tan alta como 45 grados Celsius. Generalmente prefieren un pH en el rango de 4,05 - 4,50, sin embargo ciertas cepas pueden tolerar y crecer a pH arriba de 9 o tan bajo como 3,20.

La principales contribuciones de estas bacterias en el producto alimenticio es el de preservar las cualidades nutritivas de las materias primas, extender la vida de anaquel, y controlar el crecimiento de microorganismos indeseados.

A pesar de que este grupo es conocido por ser exigente respecto a los requerimientos nutricionales, existen especies que son muy versátiles y crecen razonablemente bien incluso cuando el contenido de nutrientes es menor al ideal.

Las bacterias ácido-lácticas poseen dos vías fermentativas denominadas homolácticas u homofermentativas, y heterolácticas o heterofermentativas. Estos microorganismos poseen una u otra, sin embargo algunas poseen los medios para llevar a cabo ambas vías, denominándoseles homofermentativas facultativas.

Existen 16 géneros de bacterias ácido-lácticas. Doce géneros están relacionados con los alimentos, de los cuales siete son utilizadas directamente en las fermentaciones alimentarias: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, y *Tetragenococcus*.

Figura 17. **Géneros de bacterias ácido-lácticas y sus propiedades**

Género	Ruta de fermentación	Temperatura:		NaCl:		pH:		Isómero del ácido láctico
		10°C	45°C	6,5%	18%	4,4	9,6	
<i>Lactobacillus</i>	homo/hetero	±	±	±	-	±	-	D, L, DL
<i>Lactococcus</i>	homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Leuconostoc</i>	hetero	+	-	±	-	±	-	D
<i>Oenococcus</i>	hetero	+	+	±	-	±	-	D
<i>Pediococcus</i>	homo	±	±	±	-	+	-	D, L, DL
<i>Streptococcus</i>	homo	-	+	-	-	-	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	homo	+	-	+	+	-	+	L
<i>Aerococcus</i>	homo	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	hetero	+	-	-	-	-	-	L
<i>Enterococcus</i>	homo	+	+	+	-	+	+	L
<i>Vagococcus</i>	homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Weissella</i>	hetero	+	-	±	-	±	-	D, L, DL

Fuente: HUTKINS, Robert Wayne. *Microbiology and technology of fermented foods*. p. 24.

La presencia del género *Enterococcus* generalmente es indeseable ya que algunas veces es utilizado como indicador de contaminación fecal, algunas cepas poseen genes móviles resistentes a los antibióticos y algunas son capaces de causar infecciones en los humanos.

De igual forma el género *Carnobacterium* es indeseable ya que es considerado como microorganismos deteriorantes de los productos cárnicos.

Finalmente los géneros *Aerococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* no son encontrados ampliamente en los alimentos y su significancia en los mismos no es clara.

Estos microorganismos son un importante grupo que contribuye a resaltar las características organolépticas de los alimentos, poseen una función antimicrobiana importante, y son considerados como el principal grupo de microorganismos probióticos.

2.4.1.2. Bacterias ácido-acéticas

Son las únicas bacterias Gram-negativas utilizadas en la elaboración de alimentos fermentados. A este grupo pertenecen los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, y *Gluconoacetobacter*.

Estas bacterias son aeróbicas obligadas. Además son mesófilas, teniendo un rango óptimo de temperatura de crecimiento de 25 a 30 grados Celsius.

Los sustratos utilizados como fuente de energía incluyen el etanol, glucosa, lactato o glicerol. La mayoría de estos compuestos no son completamente oxidados en dióxido de carbono y agua, y el ácido acético, como otros metabolitos, pueden ser acumulados en el medio.

Las bacterias ácido acéticas son los principales microorganismos oxidativos que son capaces de sobrevivir en condiciones con elevada acidez y elevado contenido de etanol. Algunas cepas son capaces de crecer en un medio con 5 por ciento en volumen de etanol, y algunas hasta un 10 por ciento.

A pesar de que son ácido-tolerantes, el pH preferido para crecer se encuentra generalmente entre 5,3 y 6,3.

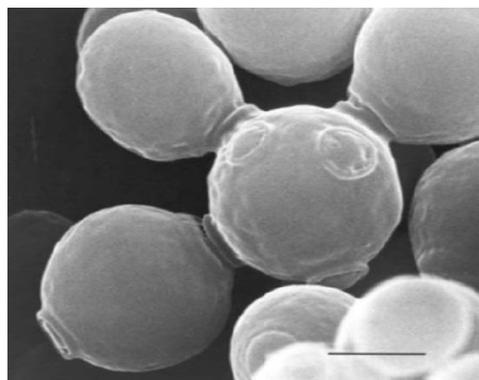
Otras bacterias también producen ácido acético como producto primario, pero éstas son anaeróbicas obligadas y dependen de vías reductoras, por ejemplo la reducción del CO₂.

2.4.1.3. Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucarióticos pertenecientes al reino fungi, no filamentosos, algunas producen esporas sexuales y otras se reproducen por mitosis o por gemación, la mayoría son aeróbicas obligadas, sin embargo algunas otras son anaerobias facultativas.

Requieren una fuente reducida de carbono, varios minerales, una fuente de nitrógeno y vitaminas, en donde las principales son el ácido pantoténico, tiamina y biotina.

Figura 18. **Gemación de las levaduras y cicatrices visibles de gemaciones anteriores**



Fuente: BAMFORTH, Charles W. *Food, fermentation and micro-organisms*. p. 30.

Son capaces de crecer en un amplio rango de fuentes de carbono, incluidos carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos, alcanos, y lípidos, sin embargo, los primeros son la fuente más común.

Mediante la glucólisis, la glucosa es oxidada a piruvato, la cual puede tener dos destinos: puede ser fermentado a etanol o puede ser oxidado a CO₂ por medio de la respiración. Además, algunas pueden producir ácido acético.

Durante la fermentación de los alimentos, las levaduras modifican las características organolépticas, físicas y nutricionales, además también sintetizan y secretan metabolitos que poseen actividades antagonistas frente a otros microorganismos.

Al contrario de las bacterias, virus y algunos hongos filamentosos, las levaduras raramente son asociadas con enfermedades o intoxicaciones alimenticias, aunque algunas son consideradas como patógenas oportunistas.

Alrededor de 21 géneros de levaduras han sido reportadas a partir de alimentos y bebidas fermentadas: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Hyphopichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, y *Zygosaccharomyces*.

Las levaduras también pueden interactuar con otros microorganismos. Por ejemplo, en las interacciones con bacterias, principalmente bacterias ácido-lácticas, comúnmente excretan ácidos orgánicos que provocan la disminución del pH del medio, lo cual inhibe el crecimiento de patógenos indeseables y promueven el crecimiento de las levaduras.

A pesar de que las bacterias ácido-lácticas son los principales microorganismos reconocidos como probióticos, las levaduras también están siendo incluidas dentro de esta clasificación.

2.4.1.4. Requerimientos nutricionales

Todos los organismos vivos necesitan de nutrientes para crecer, los cuales se utilizan para construir los bloques de los que está hecho el organismo y proveen la energía necesaria para poder llevar a cabo diversas funciones.

Los seis elementos que se necesitan en grandes cantidades, llamados macronutrientes, son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre, debido a que son los constituyentes elementales de los componentes claves de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácido nucleicos.

También, son necesarios el calcio, magnesio, potasio, sodio y hierro, y aunque también son llamados macronutrientes, son necesarios en menor cantidad que los anteriores.

Además, son necesarios los micronutrientes o elementos traza, y aunque son requeridos en muy pequeñas cantidades son tan importantes para el metabolismo como los macronutrientes. Estos son metales como el cobre, cobalto, zinc, manganeso, molibdeno, selenio y níquel, entre otros, muchos de los cuales forman parte esencial de las enzimas y cofactores.

Por último, son necesarios los factores de crecimiento, que son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, los cuales se necesitan en muy pequeñas cantidades.

Lo anterior está expresado en términos globales de los microorganismos, sin embargo diferentes microorganismos necesitan diferentes tipos de nutrientes y en diferentes cantidades, y a menudo los requerimientos de cada uno de ellos se vuelve específico.

2.4.1.5. Desarrollo microbiológico

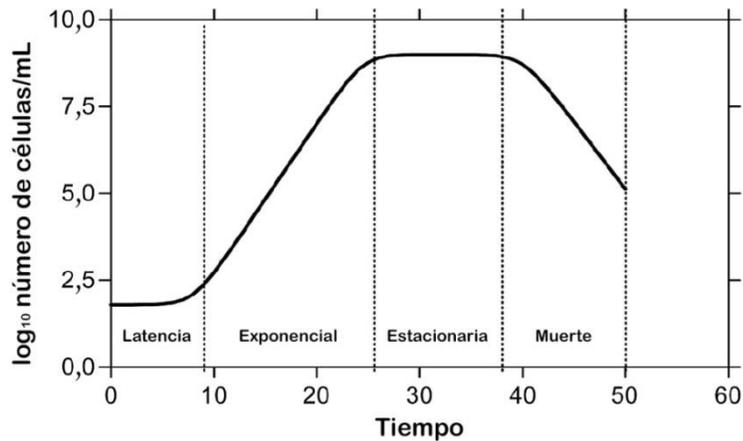
El crecimiento de los microorganismos puede definirse como un aumento en el número de células de una población, mientras que la velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células o en la masa celular por unidad de tiempo.

Cuando los microorganismos son cultivados en un sistema cerrado, en el cual no se agrega medio fresco, la concentración de los nutrientes disminuye y la concentración de los subproductos aumenta, se puede estudiar el crecimiento de las poblaciones microbianas mediante una curva de crecimiento, la cual es una representación gráfica utilizando el número de células en una escala logarítmica y el tiempo en una escala aritmética, obteniendo una gráfica semilogarítmica.

En la curva de crecimiento (figura 19) pueden identificarse cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria, y muerte.

La fase de latencia representa el período en el cual las células inoculadas se adaptan a su nuevo entorno, aumentando de tamaño y sintetizando nuevos componentes antes de iniciar la división celular. Esta fase varía considerablemente de longitud según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio.

Figura 19. **Curva de desarrollo microbiológico**



Fuente: MCKELLAR, Robin C.; LU, Xuewen. "Primary models". En: *Modeling microbial responses in food*. p. 22.

Este período puede ser largo si el inóculo procede de un cultivo viejo, si este se encontraba refrigerado o si las células del inóculo han sido dañadas parcialmente por agentes físicos o químicos, al igual que si la inoculación procede en un medio con condiciones diferentes al cultivo inicial.

Por otro lado, si un cultivo joven es transferido a un medio fresco con la misma composición, la fase de latencia puede ser corta o puede no presentarse.

Por lo tanto, resulta necesario minimizar esta fase debido a que puede consumir mucho tiempo y resultar costosa.

La fase de crecimiento, exponencial o fase logarítmica, se identifica debido a una tasa de crecimiento constante, debido a que los microorganismos se dividen y duplican su número a intervalos regulares.

Este período es cuando la población es más uniforme en términos de sus propiedades químicas y fisiológicas, así como cuando las células están en el estado fisiológico más sano.

La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente, pero las velocidades están influenciadas por las condiciones ambientales así como por las características del microorganismo. Por lo general los procarióticos crecen más rápido que los eucarióticos, y los eucarióticos de menor tamaño lo hacen más rápido que los de mayor tamaño.

La fase estacionaria puede identificarse debido a que no existe aumento o descenso neto en el número viable de células, debido a la ausencia completa de crecimiento o a que la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte.

Este período se alcanza debido al agotamiento de un nutriente esencial, o debido a la acumulación de productos de desecho hasta niveles inhibitorios.

La última fase corresponde a la de declinación o muerte, en la cual la tasa de muerte excede a la tasa de crecimiento, si acaso existiera esta última, debido a los cambios perjudiciales en el entorno, como el agotamiento de nutrientes y la acumulación de desechos nocivos.

Posee también un comportamiento exponencial, sin embargo en la mayoría de los casos la velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial.

2.4.2. Características de los alimentos fermentados

Los alimentos fermentados pueden contener diversos compuestos funcionales procedentes de la materia prima, o bien generados durante el proceso de fermentación debido a la actividad metabólica de los microorganismos. Debido a esto se ha asociado el consumo de dichos alimentos con diversos beneficios, entre los cuales se pueden mencionar:

- Antimicrobianas

Los microorganismos modifican el medio en donde se encuentran debido a su metabolismo y algunos también producen compuestos antimicrobianos, lo cual inhibe el crecimiento de microorganismos deteriorantes y patógenos, aumentando la vida de anaquel de los productos y haciéndolos seguros para su consumo.

- Nutricionales

Durante la fermentación ocurre espontáneamente el enriquecimiento biológico de los alimentos con aminoácidos esenciales, vitaminas, y compuestos bioactivos.

- Degradación de compuestos

Los microorganismos presentes producen enzimas que degradan compuestos que no son nutritivos o insatisfactorios, y transforman los sustratos en productos fácilmente digeribles. De igual forma descomponen compuestos complejos en moléculas más simples.

- Organolépticas

En resumen, los alimentos fermentados poseen sabores, olores, texturas y otros atributos muy diferentes de los que tienen las materias primas debido a la acción metabólica de los microorganismos sobre los sustratos.

- Preservantes

Se refiere al aumento del tiempo de vida o de almacenamiento de los alimentos debido a la preservación biológica.

- Probióticas

Diversos alimentos fermentados son considerados como alimentos probióticos debido a que poseen microorganismos, en cantidades suficientes, que mejoran el balance de la microbiota intestinal.

- Medicinales

La actividad anticarcinogénica y la reducción del colesterol son unos de los diferentes beneficios comprobados que poseen diversos alimentos fermentados sobre la salud.

- Económicas

Los alimentos fermentados generalmente se fabrican utilizando materias primas de bajo costo, y la mayoría de productos finales tienen moderados márgenes de ganancias.

2.5. Alimentos probióticos

Los probióticos se describen como microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped.

Los alimentos que contienen probióticos se encuentran dentro de la categoría de los alimentos funcionales, los cuales incluyen a cualquier alimento fresco o procesado que pueda proveer beneficios a la salud superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales, más allá de la función básica de suministrar nutrientes. Este efecto positivo puede ser promoviendo la salud, previniendo el padecimiento de alguna enfermedad, o ambas.

Algunos beneficios a la salud asociados con el consumo de probióticos incluyen la prevención y tratamiento de la diarrea asociada con antibióticos, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias del intestino, prevención de infecciones del tracto urinario y vaginal, la prevención y tratamiento de alergias.

Los alimentos probióticos pueden ser elaborados de dos formas, la primera es fermentando las materias primas por medio de éstos microorganismos, con o sin cultivos iniciales; y la segunda forma es por medio de la adición de probióticos en concentraciones adecuadas al producto final.

Es necesario mencionar que los alimentos fermentados son el sistema más popular de distribución de los probióticos. Conjuntamente, el jugo de fruta ha sido sugerido como un buen medio para estos microorganismos, ya que es considerado un producto saludable, además de ser atractivo al consumidor.

2.5.1. Microbiota intestinal

Cuando el ser humano nace, el tracto gastrointestinal se encuentra libre de microorganismos, sin embargo la colonización de éstos inicia inmediatamente después del nacimiento hasta llegar a estar habitado en la edad adulta por más de 100 trillones (10^{14}) de microorganismos.

La densidad de los microorganismos nativos se incrementan progresivamente de 10^2 a 10^3 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, desde el estómago hasta el colon, en donde habita la gran mayoría, teniendo una densidad aproximada de 10^{11} a 10^{12} Unidades Formadoras de Colonias por mililitro. Asimismo, la diversidad abarca microorganismos anaeróbicos facultativos y anaeróbicos obligados.

En el tracto gastrointestinal coexisten tanto especies no patógenas, en su mayoría, como otras patógenas, en donde el predominio de las primeras sobre las segundas es el resultado de un delicado equilibrio.

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son ejemplos de microorganismos beneficiosos que pueden contribuir a la digestión, la estimulación inmunológica, y la inhibición de patógenos; mientras que las especies de *Bacteroides*, *Escherichia*, *Clostridium*, y *Proteus* son ejemplos de microorganismos potencialmente perjudiciales encontrados en el tracto gastrointestinal.

Los microorganismos perjudiciales en el intestino han sido vinculados a diversos desórdenes clínicos tales como el cáncer, colitis ulcerativa, e incluso el aumento de la susceptibilidad del huésped a las infecciones por enteropatógenos como la *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia*, y *Listeria*.

El uso prolongado y excesivo de antibióticos de amplio espectro, no incluir alimentos fuentes de fibra dietética, y los procedimientos invasivos como lavados gástricos o colónicos, entre otros factores, pueden alterar profundamente la composición, cantidad y calidad de la microbiota nativa, y así favorecer la colonización de cepas patógenas.

Por lo tanto, es importante mantener el correcto equilibrio de los microorganismos para permitir que el intestino opere óptimamente, para mejorar la salud, y eliminar la predisposición de contraer diversas enfermedades, en donde los probióticos pueden representar la mejor opción para lograrlo.

Se ha postulado que estos microorganismos pueden estimular la producción de sustancias antimicrobianas, la secreción de moco, fortalecer la función de barrera del intestino, competir contra los patógenos, y estimular las respuestas inmunológicas específicas y no específicas.

2.5.2. Microorganismos probióticos

Diferentes géneros de bacterias son utilizadas como probióticos, incluyendo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia* y *Enterococcus*.

Los dos primeros géneros de bacterias son los representantes probióticos más importantes de las bacterias ácido-lácticas, siendo este grupo los principales microorganismos utilizados como probióticos potenciales.

De la misma forma, las levaduras han sido utilizadas ampliamente como agentes probióticos, principalmente del género *Saccharomyces*.

Es necesario mencionar que los beneficios de los probióticos dependen de la cepa y son específicos de cada una de ellas, y los efectos documentados de una cepa no son aplicables a otras.

2.5.2.1. Características deseables

Los microorganismos deben ser seguros, deben poseer el estado *GRAS*, y deben de tener un largo historial de su utilización segura en los alimentos. Ninguno debe poseer propiedades patogénicas e idealmente deben exhibir tolerancia a las sustancias antimicrobianas, pero no deben ser capaces de transmitir esa resistencia a otros microorganismos.

Se requiere que posean la capacidad de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal para que así puedan conferir los beneficios al huésped. Deben poseer tolerancia a ambientes ácidos, a las enzimas presentes en el tracto, al jugo gástrico humano, y al jugo biliar.

Es importante que tengan la capacidad de adherirse en el tracto gastrointestinal, para aumentar así su efecto probiótico.

La adhesión a la mucosa del intestino se considera importante para la modulación del sistema inmunológico y para la exclusión de los patógenos, ya sea ésta última por la competición de nutrientes, por la competición de locaciones físicas, o por la producción de agentes antimicrobianos.

Deben ser tecnológicamente adecuados para su incorporación en los alimentos, deben de ser capaces de sobrevivir a las aplicaciones industriales, de prosperar al final de su vida de anaquel, y de mantener características organolépticas aceptables durante todo el tiempo de almacenamiento.

Por encima de todo, los alimentos probióticos deben demostrar su eficacia en ensayos clínicos controlados y validados, y demostrar que las características probióticas no se han perdido o han sido alteradas durante su manufactura.

2.5.2.2. Dosificación

Para obtener los efectos probióticos, los microorganismos deben ser administrados en cantidades suficientes, por lo que los organismos reguladores de alimentos estipulan que cualquier alimento probiótico debe contener por lo menos 10^7 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro al momento de ser consumido.

El método de administración parece tener un mínimo efecto en la eficacia probiótica. Asimismo, no está claro si la frecuencia de administración tiene algún efecto en la eficacia probiótica, sin embargo microbiológicamente una dosis de 1×10^{10} Unidades Formadoras de Colonia administrada cuatro veces al día es ligeramente diferente a una dosis de 4×10^{10} Unidades Formadoras de Colonias administrada una vez al día.

La duración de la administración puede depender de las necesidades y de la naturaleza de las enfermedades. Por ejemplo, el tratamiento para la diarrea es a corto plazo, mientras que la prevención del cáncer es a largo plazo.

Además, aunque no existe información acerca de cuándo es el mejor tiempo para su ingesta, se asume que el mejor período para la administración de los probióticos es entre comidas, y deben ser acarreados en un medio líquido.

2.5.2.3. Viabilidad

Generalmente las cantidades de probióticos en los alimentos disminuyen durante su almacenamiento, por lo que existe una fuerte exigencia para mantener la viabilidad de los microorganismos durante su producción y vida de anaquel.

Los principales factores que influyen la habilidad de los probióticos para sobrevivir en los alimentos incluyen:

- El estado fisiológico de los microorganismos añadidos
- Las condiciones físicas y químicas del procesamiento del alimento
- Las condiciones ambientales de su transporte y almacenamiento
- La composición del producto
- Las interacciones con otros compuestos

Algunas veces se puede alcanzar un conteo viable aceptable incrementando la cantidad de microorganismos durante la manufactura, sin embargo esto puede llegar a ser costoso debido al valor elevado de los cultivos.

2.6. Técnicas de preservación

Existen diversas técnicas para la preservación de las propiedades de los alimentos, y para el control de los microorganismos.

Con base en el modo de acción, la mayoría de los métodos de preservación de los alimentos pueden ser categorizados como:

- Desacelerando o inhibiendo la deterioración química y el crecimiento microbiano
- Inactivando directamente las bacterias, levaduras, mohos, virus, o enzimas
- Evitando la contaminación antes y después del procesado

Sin embargo, para el presente estudio de fermentación, el cual por sí mismo es un método de preservación, se utilizarán cuatro métodos: asepsia, desinfección, esterilización, y refrigeración.

2.6.1. Asepsia

La asepsia involucra la limpieza general y es un procedimiento de rutina que ayuda a eliminar los focos de crecimiento microbiano, ayuda a reducir la carga de microorganismos, y previene la transferencia de organismos del individuo al producto.

Se utilizan batas de laboratorio, mascarillas, guantes, y otras prendas protectoras; las manos son lavadas con regularidad; y el equipo utilizado y los pisos son lavados con agua, jabón, y con desinfectantes.

Para lavar las manos se necesita mojar las manos y las muñecas con agua, tomar una dosis de jabón con el antebrazo o con el codo, frotar las manos y muñecas con el jabón durante 10 a 15 segundos, enjuagar las manos, y luego secar las manos sin frotarlas con una toalla de papel. Además, la llave del grifo se apaga mientras se sostiene la toalla de papel, para no contaminar las manos nuevamente.

2.6.2. Desinfección

La desinfección es el proceso por el cual se eliminan la mayoría de microorganismos, generalmente con la excepción de las endosporas.

Los desinfectantes pueden ser sub categorizados como desinfectantes de alto nivel, los cuales eliminan todos los microorganismos con la excepción de un largo número de endosporas con un prolongado período de exposición; los de nivel intermedio, los cuales eliminan la mayoría de microorganismos y virus, pero no las endosporas; y los desinfectantes de bajo nivel, los cuales eliminan la mayoría de las bacterias vegetativas, algunos del reino fungi, y algunos virus.

Entre los desinfectantes más comúnmente utilizados se encuentra el hipoclorito, el etanol, y el alcohol isopropílico.

El etanol es letal para las bacterias esporulantes y destruye las micobacterias, además es de rápida acción. Sin embargo, es inefectivo en cualquier concentración contra las esporas bacterianas.

El alcohol isopropílico es un desinfectante más efectivo que el etanol, sin embargo tampoco es esporicida. Es efectivo contra los virus, con excepción de aquellos virus sin una cobertura lipídica. Ambos alcoholes son más efectivos a concentraciones del 70 por ciento.

El hipoclorito es un desinfectante de amplio espectro, aunque posee una menor actividad contra las esporas que contra las bacterias no esporulantes, es efectivo contra los virus lipídicos y no lipídicos, y posee una baja actividad contra las micobacterias. Sin embargo, es irritante, corrosivo, y puede dejar residuo que afecten el crecimiento de los microorganismos deseados.

2.6.3. Esterilización

La esterilización es un proceso que implica la destrucción, inactivación o remoción de todos los microorganismos viables, incluyendo las formas vegetativas y esporulantes de las bacterias, levaduras, mohos, protozoos y virus, por medios mecánicos, térmicos, químicos, o por radiación.

Una definición más acertada es el de reducir la probabilidad de supervivencia de los microorganismos a un nivel aceptable. Esto se ha originado a partir del concepto matemático de que la destrucción de los microorganismos es una función probabilística, basado en la duración de la exposición al agente mortal.

Cuando se utiliza calor, puede ser calor húmedo o calor seco. El primero de ellos bajo presión es proveído mediante una autoclave, mientras que el segundo es proveído por hornos.

Figura 20. **Relación de temperatura-tiempo en los procesos térmicos de esterilización**

Proceso	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
Calor húmedo (autoclave)	121	15
	126	10
	134	3
Calor seco	Mínimo de 160	No menos de 120
	170	60
	180	30

Fuente: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. FRAISE, Adam P.; LAMBERT, Peter A.; MAILLARD, Jean-Yves (eds.) p. 364.

De las diversas técnicas, el vapor es el más utilizado para la esterilización de equipo y medios, el cual se encuentra bajo presión debido a que mientras mayor sea la presión del sistema, mayor será la temperatura de operación.

Figura 21. **Relación de temperatura-presión en la esterilización por vapor**

Temperatura (°C)	Presión de vapor	
	kPa	psi
121	103	15
126	138	20
134	207	30

Fuente: *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. FRAISE, Adam P.; LAMBERT, Peter A.; MAILLARD, Jean-Yves (eds.) p. 364.

2.6.4. Refrigeración

El uso de bajas temperaturas para preservar los alimentos se basa en el hecho de que las actividades de los microorganismos pueden desacelerarse a temperaturas arriba del punto de congelación, y en general pueden detenerse a temperaturas bajo cero, debido a que todas las reacciones metabólicas son catalizadas enzimáticamente, y estas dependen de la temperatura.

Existen 3 distintos rangos de temperatura para el almacenamiento de alimentos a baja temperatura.

La temperatura ambiente se encuentra usualmente entre 10 y 15 grados Celsius. La temperatura de refrigeración se encuentra entre 0 y 7 grados Celsius, idealmente no mayor a 4,4 grados Celsius. Finalmente la temperatura de congelación es aquella que se encuentra por debajo de -18 grados Celsius.

2.7. Análisis cuantitativos

La investigación científica conlleva la determinación cuantitativa y el monitoreo de diversas propiedades físicas, químicas y/o microbiológicas del objeto de estudio.

2.7.1. Físicos

Dichos análisis son aquellos que determinan las propiedades y el comportamiento de la energía, la materia, el tiempo y el espacio, así como las interacciones entre dichos conceptos.

Con base en los objetivos de la presente investigación, únicamente se evaluarán 3 parámetros físicos: peso drenado, peso seco y densidad relativa.

2.7.1.1. Peso drenado

El peso drenado, denominado también como masa drenada o escurrida, es la cantidad de materia sólida o semisólida presente después de que el contenido en exceso del líquido en el que se encuentra ha sido separado completamente.

Para llevar a cabo esta separación, la fase sólida y la fase líquida se deben verter sobre la superficie de un tamiz, inclinándolo posteriormente para facilitar el drenado, pero sin sacudir el material en el tamiz, dejándolo drenar por dos minutos.

Esta separación se basa en el tamaño de la partícula que se desea separar, y el flujo debe llevarse a cabo por gravedad.

2.7.1.2. Peso seco

El peso seco es la masa de un material sólido resultante después de separar toda el agua o líquido posible por métodos no mecánicos.

Los tres métodos utilizados para secar son el térmico, el químico, y por medio de vacío. Sin embargo el más común es el térmico en el cual se separa la fase líquida mediante evaporación al suministrarle calor.

El componente a cuantificar, o analito, puede ser el residuo que finalmente se pesa o puede ser el compuesto evaporado.

El primer caso consiste en un método directo por evaporación, ya que se pesa directamente el analito. El segundo caso consiste en un método indirecto por evaporación, debido a que la masa de analito se determina por diferencia entre la muestra inicialmente pesada y el residuo que queda luego de la evaporación.

2.7.1.3. Densidad relativa

La densidad relativa, denominada como *specific gravity* en inglés, es utilizada comúnmente para determinar el contenido alcohólico, la humedad y el contenido de sólidos en numerosos productos alimenticios.

Sin embargo, esto se aplica de mejor forma en el análisis de soluciones acuosas que contienen únicamente un soluto.

Este parámetro puede determinarse por medio de la comparación de las masas de volúmenes iguales de la muestra y agua utilizando un picnómetro.

Asimismo, las temperaturas de los líquidos se expresan en forma de cociente, utilizando la temperatura de la muestra en el numerador y la del agua en el denominador.

Los sólidos solubles totales determinados a través de la densidad relativa son expresados en grados Brix, como porcentaje en peso de sacarosa en solución.

Esta variable se utiliza como indicador del contenido de azúcares en las frutas y jugos de frutas ya que son los principales sólidos disueltos en estos, conteniendo además pectinas solubles, ácidos orgánicos y aminoácidos, entre otros.

Por lo tanto, representa únicamente la cantidad de sólidos disueltos totales en la muestra como si éstos fueran exclusivamente sacarosa.

Durante la fermentación, los azúcares contenidos inicialmente son transformados por los microorganismos en diversos compuestos orgánicos, reduciendo la densidad de la solución. Por lo que un valor constante en la densidad indica la finalización de la fermentación.

Entre los errores que se pueden cometer al utilizar la densidad relativa para determinar los grados Brix es la presencia de sólidos en suspensión y dióxido de carbono en la muestra, por lo cual es necesario removerlos previamente.

La densidad relativa puede determinarse también por hidrometría y los sólidos solubles totales pueden establecerse también por refractometría.

2.7.2. Químicos

Los análisis químicos son aquellos que determinan la composición química de un material o muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio.

Con base en los objetivos de la presente investigación, únicamente se evaluarán dos parámetros químicos, los cuales a pesar de estar directamente relacionados con la acidez, son determinados en formas separadas: acidez titulable y acidez activa (pH).

2.7.2.1. Acidez total titulable

La acidez titulable, conocida también como acidez total, determina la concentración total de ácido contenida en el alimento.

Los ácidos de los alimentos se encuentran presentes naturalmente, sin embargo también pueden ser formados por medio de la fermentación o pueden ser añadidos como parte de una formulación específica.

La determinación se realiza neutralizando los ácidos presentes en una muestra conocida de alimento utilizando una base estándar por medio de una titulación, en donde el punto final o punto de equivalencia, puede ser determinado por medio del método potenciométrico o colorimétrico.

Debido a que esta titulación no puede diferenciar entre ácidos individuales, el resultado es expresado en términos del ácido predominante.

2.7.2.2. Acidez activa

La acidez activa cuantifica la actividad de los iones hidronio (H_3O^+) en una solución, expresada en términos de pH.

El término pH es definido como el logaritmo negativo de base 10 de la concentración molar de los iones hidronio. Sin embargo, la definición real es el logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidronio y no de su concentración.

$$\text{pH} = -\log_{10}A_{\text{H}^+} = -\log[\text{H}^+] * \gamma_{\text{H}^+}$$

Es necesario mencionar que la actividad de una especie es su concentración multiplicada por su coeficiente de actividad, el cual es una medida de la desviación respecto al comportamiento ideal. Si el coeficiente de actividad fuera 1, el comportamiento sería ideal.

En la naturaleza, el pH puede abarcar un rango de 14 órdenes de magnitud, los cuales se expresan en una escala que va desde 0 hasta 14 en soluciones acuosas.

Este parámetro es importante debido a que existen algunos procesos que son más dependientes de esta actividad que de la acidez total, como la habilidad de crecimiento de los microorganismos en un determinado alimento.

2.7.3. Microbiológicos

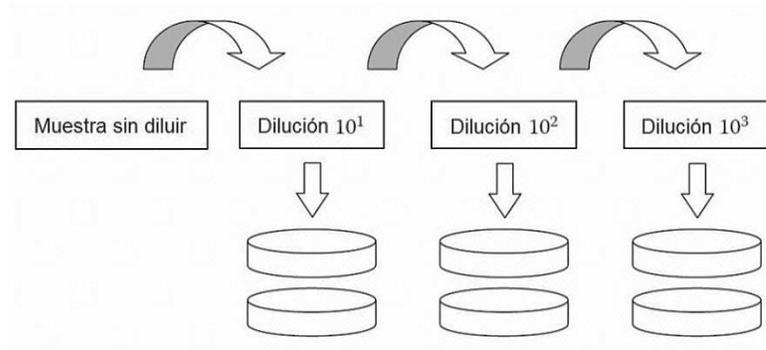
Los análisis microbiológicos de los alimentos son aquellos que identifican y cuantifican a los microorganismos presentes en los productos alimenticios, determinan los factores de los que depende su presencia y desarrollo en estos, así como su interacción con los seres humanos.

Con base en los objetivos de la presente investigación, únicamente se evaluarán un parámetro microbiológico: recuento de microorganismos.

2.7.3.1. Recuento de microorganismos

Para cuantificar a los microorganismos presentes en las muestras, se utilizará el método de recuento en placa.

Figura 22. Diluciones en serie para el recuento en placa



Fuente: GOLDMAN, Emanuel; GREEN Lorrence H. *Practical handbook of microbiology*. p. 17.

Este método es realizado por medio de la dilución de la muestra original en tubos de dilución en serie. Seguido a esto, se aplican alícuotas de las diluciones en serie en placas con agar adecuado para recuento en placa, por medio de la técnica de vertido o de propagación.

En la técnica de vertido en placa, se vierte el agar líquido a temperatura ambiente en la placa respectiva, y se mezcla con la alícuota de la muestra diluida. Mientras que en la técnica de la propagación en placa, se adiciona y se dispersa la alícuota de la muestra diluida en la superficie del agar previamente solidificado en la placa respectiva.

Posteriormente las placas son incubadas apropiadamente, y cada colonia observada es contabilizada como una Unidad Formadora de Colonia. En este conteo se asume que cada colonia se encuentra separada y que fue desarrollada por una única célula viable.

El total de las Unidades Formadoras de Colonias contabilizadas en las placas incubadas y el respectivo factor de dilución utilizado, es combinado posteriormente para calcular el número original de microorganismos en la muestra como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro.

Para la cuantificación de bacterias ácido-lácticas se utilizará el medio de cultivo *MRS Agar* (Merck).

Mientras que para la cuantificación de levaduras se utilizará el medio de cultivo *YGC Agar* (Merck), el cual contiene cloranfenicol para suprimir el crecimiento de las bacterias que se encuentren presentes.

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Como resultado de la investigación, recopilación y estudio de la información presente en libros y en artículos científicos sobre los factores que influyen en el proceso de fermentación, se determinaron las variables independientes que permanecieron constantes y las que fueron modificadas para medir su efecto sobre las variables dependientes o de respuesta.

Tabla III. **Definición operacional y descripción de las variables independientes**

No.	Variable	Dimensional	Constante	Variable	Descripción
1	Inóculo	g/mL		X	Masa inicial de granos de tибicos por volumen de sustrato.
2	Volumen inicial de sustrato	mL	X		Volumen del jugo del corazón de la piña a utilizarse como medio de fermentación.
3	Acidez activa inicial del sustrato	pH	X		pH inicial del jugo del corazón de la piña original.
4	Temperatura	°C	X		Temperatura del proceso de fermentación.
5	Tiempo	h		X	Tiempo de fermentación.
6	Carga microbiana inicial	UFC/mL	X		Microorganismos contenidos en el jugo del corazón de la piña.

Fuente: elaboración propia.

Tabla IV. **Definición operacional y descripción de las variables dependientes**

No.	Variable	Dimensional	Descripción
1	Biomasa drenada	g/mL	Masa de los granos de tibicos drenados.
2	Biomasa seca	g/mL	Masa de los granos de tibicos secos.
3	Densidad relativa	-----	Masa por unidad de volumen del medio fermentado respecto a la masa por unidad de volumen del agua.
4	Acidez activa	pH	Actividad de iones hidronio en el medio fermentado.
5	Acidez total titulable	g/mL	Acidez total titulable del medio fermentado expresada como su equivalente de ácido láctico.
6	Población total de bacterias ácido-lácticas	UFC/mL	Población total de bacterias ácido lácticas viables en el medio fermentado.
7	Población total de levaduras	UFC/mL	Población total de levaduras viables en el medio fermentado.

Fuente: elaboración propia.

3.2. Delimitación del campo de estudio

Es la circunscripción específica del campo, área, línea y sector industrial de los cuales forma parte la investigación, así como el lugar, espacio físico o ambiente geográfico en donde se ejecutó dicho proyecto.

- Campo: ingeniería química
- Área: bioquímica

- Línea: fermentación
- Industria: tecnología de los alimentos
- Proceso: evaluación de la capacidad de fermentación de los granos de tибicos utilizando el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) procedente de los subproductos de la industria alimenticia.
- Ubicación: el eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) de la variedad Cayena Lisa se obtuvo de la empresa Alimentos Montesol S. A. ubicada en el kilómetro 1,5 carretera a Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala. Los granos de tибicos fueron obtenidos de una residencia particular en la ciudad de Guatemala. Los análisis físicos y químicos fueron realizados en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería, mientras que los análisis microbiológicos serán realizados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ciudad Universitaria, zona 12, Guatemala.
- Clima: templado, con una temperatura promedio anual máxima de 25,7 grados Celsius, mínima de 15,0 grados Celsius, y media de 19,9 grados Celsius, así como una humedad relativa media de 76 por ciento y presión atmosférica media de 85,6061 kilo-Pascales durante el 2011, según el Instituto Nacional de Sismología, Vulcanología, Meteorología e Hidrología.

3.3. Recursos humanos disponibles

Es el conjunto de personas que contribuyó al desarrollo de la investigación, aportando su desempeño y conocimientos, desde la preparación hasta la presentación del informe final.

- Investigador: Br. Jaime Ernesto Catalán Garrido
- Asesor: Ing. Qco. César Alfonso García Guerra
- Co-asesor: Inga. Qca. Hilda Palma de Martini
- Análisis externos: Dra. Virginia Bolaños de Corzo

3.4. Recursos materiales disponibles

Es el conjunto de todos aquellos recursos tangibles y de consumo que fueron utilizados en el desarrollo de la investigación, tales como materias primas, reactivos, insumos, cristalería y equipo.

- Materias primas
 - Eje de la inflorescencia de la piña
 - Granos de tибicos
- Reactivos
 - Agua desmineralizada para uso industrial, Agua Pura Salvavidas
 - Alcohol isopropílico, grado industrial
 - Fenólfaleína en polvo, Merck Millipore
 - Ftalato ácido de potasio, Merck Millipore
 - Hidróxido de sodio, lentejas, Merck Millipore

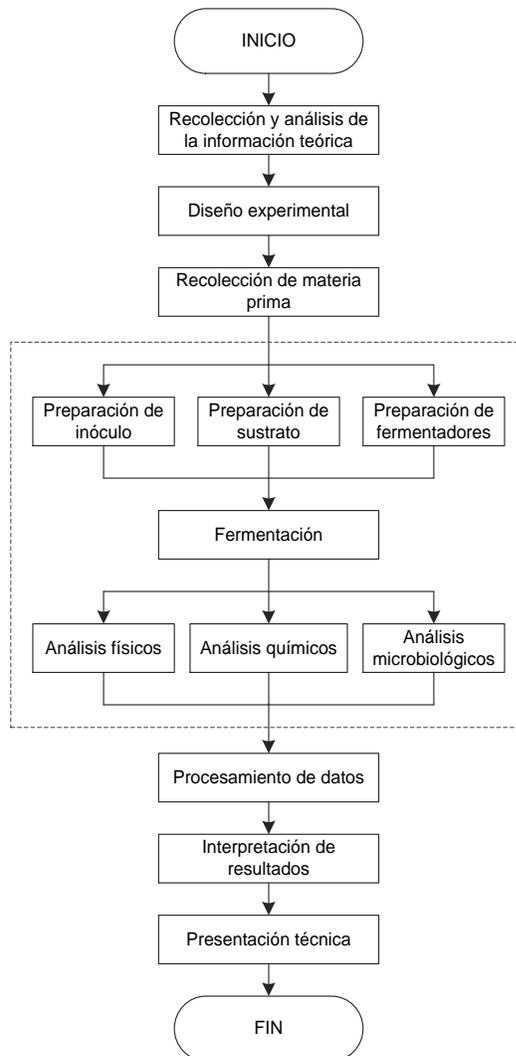
- Silica gel con indicador de humedad, Merck Millipore
- Soluciones tampón de pH 4, 7 y 10
- Equipo de medición
 - Químico
 - Potenciómetro portátil, Kit, pH 330i, WTW
 - Másico
 - Balanza analítica, WPS 750/C/1, RADWAG
 - Volumétrico
 - Balón aforado – 100 mL
 - Balón aforado – 1000 mL
 - Bureta – 25 mL
 - Picnómetro – 5 mL
 - Pipeta volumétrica – 10 mL
 - Probeta – 100 mL
 - Térmico
 - Termómetro
- Equipo auxiliar
 - Mecánico
 - Extractor de jugo centrífugo, Oster 3169-012
 - Vidrio
 - Beacker – 50 mL
 - Beacker – 100 mL
 - Beacker – 400 mL
 - Beacker – 2 000 mL
 - Desecadora
 - Embudo de vidrio
 - Erlenmeyer – 50 mL
 - Erlenmeyer – 250 mL
 - Erlenmeyer – 4 000 mL

- Vidrio de reloj
- Metálico
 - Espátula de laboratorio de acero inoxidable
- Plástico
 - Agitador magnético
 - Colador
 - Pisseta – 500 mL
 - Propipeta – 25 mL
 - Hielera 45.4 L, Rubbermaid
- Térmico
 - Eléctrico
 - Autoclave eléctrica, 25X-120V, *All American*
 - Baño de agua, H-1930, Humboldt
 - Horno de convección forzada, *Ovens*, PremLab
 - Plancha de calentamiento, *Fisher Scientific*, 11-100-49SH
 - Refrigerador, FR147RV, Daewoo
- Consumibles
 - Cinta para autoclave
 - Gasa
 - Guantes descartables de látex
 - Hielo
 - Mascarilla
 - Papel Kraft
 - Papel absorbente en rollo para secado y limpieza

3.5. Técnica cuantitativa

Debido a la naturaleza del objeto de estudio, la investigación se desarrolló a través de técnicas cuantitativas con base en las variables descritas, utilizando parámetros cualitativos como apoyo en la interpretación del estudio.

Figura 23. **Diseño general para la técnica cuantitativa**



Fuente: elaboración propia.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

Define los métodos a través de los cuales se realizó la recopilación y el ordenamiento de los datos, es decir los métodos de experimentación, necesarios para llevar a cabo la investigación.

3.6.1. Preparación del inóculo

El inóculo consiste en una pequeña cantidad de granos de tibicos utilizados como fuente de los microorganismos que llevarán a cabo el proceso de fermentación.

3.6.1.1. Obtención

Debido a que en Guatemala no existe un lugar específico de venta y distribución de granos de tibicos, éstos fueron obtenidos a través de una familia particular residente en la ciudad de Guatemala.

3.6.1.2. Acondicionamiento

Para eliminar de los granos de tibicos las influencias resultantes de las diferentes condiciones de fermentación previas, estos fueron acondicionados asépticamente antes de cada proceso fermentativo de la siguiente forma:

- Recuperación de los granos de tibicos por tamizado.
- Lavado de los granos con agua potable para su limpieza.
- Preparación de 3 000 mililitros del medio de fermentación.
- Esterilización del medio de fermentación.

- Inoculación del medio de fermentación con los granos de tibicos, según la concentración indicada en la tabla V.
- Fermentación durante 24 horas.

3.6.2. Preparación del sustrato

El sustrato es la sustancia en la cual se desarrollarán los microorganismos presentes en los granos de tibicos, a través de la fermentación de los nutrientes contenidos en el mismo.

3.6.2.1. Obtención

El eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) de la variedad Cayena Lisa, con un contenido superior a 8 grados Brix, se obtuvo de la empresa Alimentos Montesol S. A., ubicada en el kilómetro 1,5 carretera a Bárcenas Villa Nueva, Guatemala.

3.6.2.2. Extracción del jugo

El jugo del eje de la inflorescencia de la piña se encuentra contenido dentro de una matriz de fibras densamente formadas y, para aumentar la eficiencia de la fermentación, fue necesario que el sustrato (jugo del eje de la inflorescencia de la piña) y los microorganismos estuvieran en contacto directo.

Por lo tanto, mecánicamente se separó el jugo de la fibra utilizando un extractor de jugo doméstico, bajo condiciones asépticas, de la siguiente forma:

- Lavado de las partes externas del extractor con agua y jabón.
- Aplicación de desinfectante sobre las partes externas del extractor.

- Período de espera de 5 minutos.
- Enjuague de partes externas del extractor con agua desmineralizada.
- Secado de las partes externas del extractor.
- Encendido el extractor.
- Alimentación del extractor con el eje de la inflorescencia de la piña.
- Recuperación del jugo extraído.
- Apagado del extractor.
- Lavado de las partes móviles y no móviles del extractor.

3.6.2.3. Filtración

Para evitar la interferencia de los sólidos en suspensión durante los análisis cuantitativos, el jugo del eje de la inflorescencia de la piña fue filtrado de la siguiente forma:

- Filtrado del jugo procedente directamente del extractor a través de un colador fino
- Filtrado del jugo previamente colado a través de un filtro de tela
- Filtrado del jugo anterior a través de un doble filtro de tela

3.6.2.4. Esterilización

Para asegurar que el proceso de fermentación fue desarrollado únicamente por los microorganismos presentes en los granos de tибicos, el jugo del eje de la inflorescencia fue esterilizado de la siguiente forma:

- Lavado de los matraces Erlenmeyer con agua y con jabón.
- Enjuagado con agua desmineralizada.
- Secado al aire.

- Adición de 3000 mL de sustrato filtrado (para el acondicionamiento).
- Adición de 200 mL de sustrato filtrado (para los fermentadores).
- Cobertura de la boquilla de los matraces Erlenmeyer con papel Kraft (lado áspero hacia el exterior).
- Sellado de los matraces Erlenmeyer con papel Kraft utilizando cinta para autoclave.
- Adición de agua desmineralizada en la autoclave.
- Colocación de los matraces uno seguido del otro.
- Determinación de las condiciones de esterilización (figura 21).
- Cerrado y encendido de la autoclave.
- Toma del tiempo de esterilización desde el momento en que la presión del manómetro es igual a la presión determinada.
- Apagado de la autoclave al finalizar el tiempo de esterilización.
- Período de espera hasta que la presión interna sea segura.
- Extracción cuidadosa de los matraces esterilizados con el objetivo de evitar heridas por quemadura, la ruptura del sello y la contaminación de los medios esterilizados.

3.6.3. Preparación de los fermentadores

Debido a que los fermentadores (biorreactores) fueron el sistema que mantuvo el ambiente biológicamente activo, fue necesario acondicionarlo previo a los procesos de fermentación para evitar la presencia de microorganismos foráneos.

3.6.3.1. Esterilización

Los matraces Erlenmeyer fueron esterilizados simultáneamente con el sustrato siguiendo el procedimiento especificado en el inciso 3.6.2.4.

3.6.4. Fermentación

El proceso de fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, mediante el uso de granos de tибicos, fue dividido en dos fases: inoculación e incubación.

3.6.4.1. Inoculación

Se llevaron a cabo tres variaciones en la concentración de los granos de tибicos, los cuales fueron inoculados asépticamente en 200 mililitros de sustrato filtrado y esterilizado.

Tabla V. **Variación de las concentraciones de granos de tибicos inoculados**

No.	Inóculo (g)	Sustrato (mL)	Concentración (g/mL)
1	3	200	0,015
2	6	200	0,030
3	12	200	0,060

Fuente: elaboración propia.

3.6.4.2. Incubación

Las fermentaciones se llevaron a cabo asépticamente dentro de matraces Erlenmeyer de 250 mililitros, a temperatura constante de 30 grados Celsius utilizando un baño de agua, sin agitación, y sin aireación, durante un período de 72 horas.

Tabla VI. **Identificación de las fermentaciones simultáneas para cada proceso fermentativo**

Variación de inóculo	Tiempo de fermentación (h)	Réplicas	
		Primera	Segunda
X	0	1-X-0	2-X-0
	12	1-X-1	2-X-1
	24	1-X-2	2-X-2
	36	1-X-3	2-X-3
	48	1-X-4	2-X-4
	60	1-X-5	2-X-5
	72	1-X-6	2-X-6

Fuente: elaboración propia.

En cada proceso fermentativo, propio de cada variación de la proporción de los granos de tibicos, se realizaron catorce fermentaciones simultáneas correspondientes a cada muestreo en duplicado, cada una dentro de un matraz Erlenmeyer utilizado como biorreactor.

Este proceso se realizó de la siguiente forma:

- Vertido de agua potable dentro del equipo de baño de agua, hasta rebasar la superficie del sustrato contenido en los matraces Erlenmeyer.
- Incremento de la temperatura del baño de agua a 30 grados Celsius.
- Pesado de la cantidad de inóculo según corresponda (tabla V).
- Remoción del papel Kraft del matraz a inocular.
- Adición cuidadosa de los granos de tibicos utilizando una cucharilla de acero inoxidable lavada y desinfectada.
- Cobertura de la boquilla de los matraces con gasa de algodón.
- Colocación de los matraces dentro del equipo de baño de agua.
- Colocación de la tapa del equipo baño de agua.

3.6.5. Análisis cuantitativos

En cada proceso fermentativo se realizaron en duplicado los análisis físicos, químicos, y microbiológicos, exceptuando la acidez total titulable debido a la variación de los resultados a causa del tiempo de retraso entre la primera determinación y su duplicado.

Los análisis se efectuaron en intervalos de doce horas, con la excepción de los análisis microbiológicos que se llevaron a intervalos de 24 horas, desde el tiempo cero hasta las 72 horas de fermentación.

Tabla VII. **Identificación y distribución de los análisis cuantitativos para cada proceso fermentativo**

Variación de inóculo	Tiempo (h)	Biomasa		Medio fermentado			
		Concentración de la biomasa drenada y de la biomasa seca		Densidad relativa, acidez activa y acidez total titulable		Recuento de bacterias ácido lácticas y de levaduras	
		Réplicas		Réplicas		Réplicas	
		Primera	Segunda	Primera	Segunda	Primera	Segunda
X	0	1-X-0	2-X-0	1-X-0	2-X-0	1-X-0	2-X-0
	12	1-X-1	2-X-1	1-X-1	2-X-1	–	–
	24	1-X-2	2-X-2	1-X-2	2-X-2	1-X-2	2-X-2
	36	1-X-3	2-X-3	1-X-3	2-X-3	–	–
	48	1-X-4	2-X-4	1-X-4	2-X-4	1-X-4	2-X-4
	60	1-X-5	2-X-5	1-X-5	2-X-5	–	–
	72	1-X-6	2-X-6	1-X-6	2-X-6	1-X-6	2-X-6

Fuente: elaboración propia.

Los análisis correspondientes al tiempo cero se realizaron al medio de fermentación y a los granos de tибicos al momento de iniciar las demás fermentaciones simultáneas.

- **Peso drenado**
 - Tarado de un vidrio de reloj, limpio y seco.
 - Vertido del contenido del Erlenmeyer a través de un colador fino.
 - Vertido de agua potable sobre la biomasa retenida para lavarla.
 - Período de reposo de la biomasa de dos minutos, sin sacudir.
 - Vertido de la biomasa retenida y drenada en el vidrio de reloj.
 - Pesado.

- **Peso seco**
 - Colocación del vidrio de reloj con la biomasa drenada dentro del horno.
 - Incremento de la temperatura del horno hasta 90 grados Celsius.
 - Período de espera de 24 horas.
 - Extracción del vidrio de reloj con la muestra del horno.
 - Colocación del vidrio de reloj con la muestra dentro de un desecador.
 - Período de espera hasta alcanzar la temperatura ambiente.
 - Pesado.

- **Densidad relativa**
 - Lavado del picnómetro con agua y con jabón.
 - Lavado del picnómetro con agua destilada y acetona.
 - Tarado del picnómetro seco y vacío.

- Deducción de la masa del aire contenida en el picnómetro adoptando la densidad del mismo como 0,0010101 gramos por mililitro.
- Enfriado de la muestra hasta la temperatura ambiente.
- Remoción del CO₂ agitando la muestra por medio de un agitador magnético durante 3 a 4 minutos.
- Llenado del picnómetro con la muestra.
- Secado del líquido desbordado por el capilar y el picnómetro.
- Pesado.

- Acidez total titulable y acidez activa
 - Preparación de una solución 0.05 molar de hidróxido de sodio.
 - Estandarización de la base utilizando ftalato ácido de potasio.
 - Calibración del potenciómetro previamente establecido.
 - Llenado de la bureta con el titulante estandarizado.
 - Remoción del CO₂ generado por la fermentación, agitando la muestra durante 3 a 4 minutos.
 - Obtención de una muestra de 10 mililitros con una pipeta volumétrica.
 - Colocación de la muestra en un beacker conteniendo un agitador magnético limpio y seco.
 - Agitación.
 - Introducción cuidadosa del electrodo en la muestra.
 - Adición de pequeñas cantidades de hidróxido de sodio hasta obtener un pH de 10.

- Población total de bacterias ácido-lácticas
 - Obtención de una muestra de 25 mililitros utilizando una jeringa estéril.

- Preparación de placas de Petri de 90 milímetros estériles con 20 mililitros de Agar MRS.
 - Preparación de tubos de ensayo con 9 mililitros de una solución de peptona estéril.
 - Medición de 10 mililitros de la muestra.
 - Multiplicación del volumen anterior por 9 y el resultado de la multiplicación fue el volumen de mililitros de diluyente que se añadieron a la muestra para obtener la dilución 1:10.
 - A partir de la dilución anterior se agregó 1 mililitros al tubo 2, se agitó, y así sucesivamente a los tubos siguientes (2 tubos).
 - A partir de las diluciones decimales, se transfirieron 0,1 mililitros a cada una de las placas con agar utilizando una pipeta desechable.
 - El inóculo se diseminó por la superficie del agar con la ayuda de la punta de la pipeta.
 - Desechado de la pipeta.
 - Reposado de las placas, una vez sembradas, hasta que el inóculo fuera absorbido.
 - Incubación durante 3 días a 35 grados Celsius o durante 5 días a 30 grados Celsius, en una atmósfera enriquecida en CO₂ (medio anaeróbico).
- Población total de levaduras
 - Obtención de una muestra de 25 mililitros utilizando una jeringa estéril.
 - Preparación de placas de Petri de 90 milímetros estériles con 20 mililitros de Agar YGC.
 - Preparación de tubos de ensayo con 9 mililitros de una solución de peptona estéril.
 - Medición de 10 mililitros de la muestra.

- Multiplicación del volumen anterior por 9 y el resultado de la multiplicación fue el volumen de mililitros de diluyente que se añadieron a la muestra para obtener la dilución 1:10.
- A partir de la dilución anterior se agregó 1 mililitro al tubo 2, se agitó, y así sucesivamente a los tubos siguientes (2 tubos).
- A partir de las diluciones decimales, se transfirieron 0,1 mililitros a cada una de las placas con agar utilizando una pipeta desechable.
- El inóculo se diseminó por la superficie del agar con la ayuda de la punta de la pipeta.
- Desechar de la pipeta.
- Reposado de las placas, una vez sembradas, hasta que el inóculo fuera absorbido.
- Incubación durante 5 días a 25 grados Celsius aeróbicamente.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

Para concentrar la información previamente recolectada, e interpretar correctamente el fenómeno de estudio, fue necesario tabular, ordenar y procesar los datos.

Dicha información fue clasificada y tabulada por medio de los formularios descritos en las tablas VIII a XIV.

Asimismo, se utilizó equipo electrónico de computación, específicamente los programas Microsoft Excel 2010 y Logger Pro Demo (versión 3.8.6.1), para procesar los datos obtenidos en forma más confiable, con mayor profundidad y en un menor tiempo.

Tabla VIII. **Formulario para la tabulación y el ordenamiento de los análisis físicos y químicos**

Análisis físico o químico								
Proporción de inóculo	Réplicas	Tiempo de fermentación						
		0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
X	Primera							
	Segunda							
Suma								
Promedio								

Fuente: elaboración propia.

Tabla IX. **Formulario para la tabulación y el ordenamiento de los análisis microbiológicos**

Análisis microbiológico					
Proporción de inóculo	Réplicas	Tiempo de fermentación			
		0 h	24 h	48 h	72 h
X	Primera				
	Segunda				
Suma					
Promedio					

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Formulario para la tabulación y el ordenamiento de los datos de las titulaciones potenciométricas**

No.	Volumen (mL)	pH	No.	Volumen (mL)	pH	No.	Volumen (mL)	pH

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Tratamiento experimental de los análisis físicos y químicos**

Análisis físico o químico								
Proporción de inóculo	Réplicas	Tiempo de fermentación						
		0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
X	Primera	Y_{1X0}	Y_{1X1}	Y_{1X2}	Y_{1X3}	Y_{1X4}	Y_{1X5}	Y_{1X6}
	Segunda	Y_{2X0}	Y_{2X1}	Y_{2X2}	Y_{2X3}	Y_{2X4}	Y_{2X5}	Y_{2X6}
Suma		T_{X0}	T_{X1}	T_{X2}	T_{X3}	T_{X4}	T_{X5}	T_{X6}
Promedio		\bar{Y}_{X0}	\bar{Y}_{X1}	\bar{Y}_{X2}	\bar{Y}_{X3}	\bar{Y}_{X4}	\bar{Y}_{X5}	\bar{Y}_{X6}

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Tratamiento experimental de los análisis microbiológicos**

Análisis microbiológico					
Proporción de inóculo	Réplicas	Tiempo de fermentación			
		0 h	24 h	48 h	72 h
X	Primera	Y_{1X0}	Y_{1X1}	Y_{1X4}	Y_{1X6}
	Segunda	Y_{2X0}	Y_{2X1}	Y_{2X4}	Y_{2X6}
Suma		T_{X0}	T_{X1}	T_{X4}	T_{X6}
Promedio		\bar{Y}_{X0}	\bar{Y}_{X1}	\bar{Y}_{X4}	\bar{Y}_{X6}

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIII. **Tratamiento experimental comparativo de los análisis físicos y químicos**

Análisis físico o químico							
Proporción de inóculo (g/mL)	Tiempo de fermentación						
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
0,015	\bar{Y}_{10}	\bar{Y}_{11}	\bar{Y}_{12}	\bar{Y}_{13}	\bar{Y}_{14}	\bar{Y}_{15}	\bar{Y}_{16}
0,030	\bar{Y}_{20}	\bar{Y}_{21}	\bar{Y}_{22}	\bar{Y}_{23}	\bar{Y}_{24}	\bar{Y}_{25}	\bar{Y}_{26}
0,060	\bar{Y}_{30}	\bar{Y}_{31}	\bar{Y}_{32}	\bar{Y}_{33}	\bar{Y}_{34}	\bar{Y}_{35}	\bar{Y}_{36}

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. **Tratamiento experimental comparativo de los análisis microbiológicos**

Análisis microbiológico				
Proporción de inóculo	Tiempo de fermentación			
	0 h	24 h	48 h	72 h
0,015	\bar{Y}_{10}	\bar{Y}_{12}	\bar{Y}_{14}	\bar{Y}_{16}
0,030	\bar{Y}_{20}	\bar{Y}_{22}	\bar{Y}_{24}	\bar{Y}_{26}
0,060	\bar{Y}_{30}	\bar{Y}_{32}	\bar{Y}_{34}	\bar{Y}_{36}

Fuente: elaboración propia.

3.8. Análisis estadístico

Para la evaluación de la capacidad fermentativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña utilizando granos de tибicos como inóculo, se realizó un análisis de varianza de dos factores con interacción en un diseño de bloques al azar para cada análisis efectuado.

El objetivo del análisis fue estudiar si los valores de una variable dependiente dependían de los niveles de dos factores o de su interacción, significando esta última que el efecto de un factor sobre la variable dependiente dependía de cuál fuera el nivel del otro factor.

En el caso general, sea Y_{ijk} la respuesta observada cuando el factor A tiene el nivel x-ésimo ($j = 1, 2, \dots, a$) y el factor B tiene el nivel y-ésimo ($k = 1, 2, \dots, b$) en la réplica i-ésima ($i = 1, 2, \dots, n$). En general, el experimento aparece como se muestra en la tabla XV.

Tabla XV. **Arreglo general de un análisis de varianza de dos factores**

		Factor B					
Factor A		1	2	...	b		
1		Y_{111}	Y_{211}	Y_{112}	Y_{212}	Y_{11b}	Y_{21b}
		...	Y_{n11}	...	Y_{n12}	...	Y_{n1b}
2		Y_{121}	Y_{221}	Y_{122}	Y_{222}	Y_{12b}	Y_{22b}
		...	Y_{n21}	...	Y_{n22}	...	Y_{n2b}
...							
a		Y_{1a1}	Y_{2a1}	Y_{1a2}	Y_{2a2}	Y_{1ab}	Y_{2ab}
		...	Y_{na1}	...	Y_{na2}	...	Y_{nab}

Fuente: MONTGOMERY, Douglas C. *Diseño y análisis de experimentos*. p. 176.

Las observaciones del diseño factorial pueden describirse con el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_x + \beta_y + (\tau\beta)_{xy} + \varepsilon_{ixy} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, n \\ x = 1, 2, \dots, a \\ y = 1, 2, \dots, b \end{cases}$$

Donde μ es el efecto promedio global, τ_x es el efecto del nivel x-ésimo del factor A de las filas, β_y es el efecto del nivel y-ésimo del factor B de las columnas, $(\tau\beta)_{xy}$ es el efecto de la interacción entre τ_x y β_y , y ε_{ixy} es un componente del error aleatorio. Puesto que existen n réplicas del experimento, existen $N = nab$ observaciones en total.

En el diseño de dos factores, los tratamientos de las filas y las columnas son de igual interés, el cual se centra en probar la hipótesis acerca de la igualdad de los efectos de los tratamientos de los renglones, por ejemplo,

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$$

$$H_1: \text{al menos una } \tau_x \neq 0$$

Y de la igualdad de los efectos de los tratamientos de las columnas, por ejemplo,

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_b = 0$$

$$H_1: \text{al menos una } \beta_x \neq 0$$

También existe interés en la interacción de los tratamientos de los renglones y las columnas. Por lo tanto, también se prueba

$$H_0: (\tau\beta)_{xy} = 0 \quad \text{para todas las } x, y$$

$$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{xy} \neq 0$$

En la tabla XVI se muestran las fórmulas para el análisis de varianza de dos factores con interacción, donde a son los niveles del factor A, b son los niveles del factor B, n corresponden al número de observaciones o repeticiones en cada casilla, N es el número total de observaciones ($N = nab$), T_{x+} corresponde al total de cada nivel del factor A, T_{+y} es el total de cada nivel del factor B, T_{xy} es el total de cada casilla, y T es el total de la muestra.

Los valores esperados de los cuadrados medios son:

$$CM_A = SC_A / (a - 1) = \sigma^2 + nb \sum_{x=1}^a \tau_x^2 / (a - 1)$$

$$CM_B = SC_B / (b - 1) = \sigma^2 + na \sum_{y=1}^b \beta_y^2 / (b - 1)$$

$$CM_{AB} = SC_{AB}/(a - 1)(b - 1) = \sigma^2 + n \sum_{x=1}^a \sum_{y=1}^b (\tau\beta)_{xy}^2 / (a - 1)(b - 1)$$

$$CM_E = SC_E/ab(n - 1) = \sigma^2$$

Cuando es verdadera la hipótesis nula de que no existen efectos de los tratamientos de los renglones, ni de los tratamientos de las columnas, ni interacción entre ellas, entonces CM_A , CM_B , CM_{AB} y CM_E son todas estimaciones de σ^2 . Sin embargo, al haber diferencias entre los efectos de los tratamientos de los renglones, por ejemplo, entonces CM_A es mayor que CM_E . De manera similar, al estar presentes efectos de los tratamientos de las columnas o de la interacción, entonces los cuadrados medios correspondientes son mayores que CM_E .

Por lo tanto, para probar la significación de los 2 efectos principales y su interacción, simplemente se dividió el cuadrado medio correspondiente por el cuadrado medio del error. Los valores grandes del cociente implicarían que los datos no apoyan la hipótesis nula.

Suponiendo que el modelo de efectos es adecuado y que los términos del error ε_{ixy} tienen una distribución normal e independiente con varianza σ^2 constante, entonces cada uno de los cocientes de cuadrados medios CM_A/CM_E , CM_B/CM_E y CM_{AB}/CM_E se distribuyen como F con $(a - 1)$, $(b - 1)$ y $(a - 1)(b - 1)$ grados de libertad en el numerador, respectivamente y $ab(n - 1)$ grados de libertad en el denominador, y la región crítica está en la cola superior de la distribución F.

Tabla XVI. **Fórmulas para el análisis de varianza de dos factores con interacción**

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F
Factor A (Filas)	$\sum_x T_{x+}^2/nb - T^2/N$	$a - 1$	$\frac{SC_A}{a - 1}$	$\frac{CM_A}{CM_E}$
Factor B (Columnas)	$\sum_y T_{+y}^2/na - T^2/N$	$b - 1$	$\frac{SC_B}{b - 1}$	$\frac{CM_B}{CM_E}$
Interacción (AB)	$SC_T - SC_A - SC_B - SC_E$	$(a - 1)(b - 1)$	$\frac{SC_{AB}}{(a - 1)(b - 1)}$	$\frac{CM_{AB}}{CM_E}$
Error ϵ	$\sum_i \sum_x \sum_y Y_{ixy}^2 - \sum_x \sum_y T_{xy}^2/n$	$N - ab$	$\frac{SC_E}{N - ab}$	-----
Total	$\sum_i \sum_x \sum_y Y_{ixy}^2 - T^2/N$	$N - 1$	-----	-----

Fuente: MONTGOMERY, Douglas C. *Diseño y análisis de experimentos*. p. 180.

En la prueba F se considera la razón de las dos varianzas muestrales, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. Si la hipótesis nula es verdadera, entonces la razón de varianzas debe estar próxima a 1.

Las diferencias respecto de 1 se deben a variaciones aleatorias, pero si las diferencias son demasiado grandes no se pueden atribuir a esta causa. Si el valor calculado de F excede un cierto valor crítico (obtenido del anexo), entonces se rechaza la hipótesis nula. Este valor crítico depende del tamaño de las dos muestras, del nivel de significación y del tipo de contraste realizado.

Asimismo, a través de un análisis probabilístico se puede saber si los resultados obtenidos son significativos o no. Cuando la probabilidad obtenida es menor que el nivel de significación, los resultados obtenidos son estadísticamente significativos. De esta forma, a menor valor de probabilidad, mayor es la seguridad de que existen diferencias significativas.

3.9. Plan de análisis de resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método objetivo, el cual sólo observa los hechos reales y rechaza todo aquello que es de carácter subjetivo, para analizar y concluir objetivamente.

3.9.1. Métodos y modelos de los datos

Los datos obtenidos de fueron analizados gráficamente, matemáticamente y estadísticamente, para de esta forma evaluar objetivamente la capacidad de fermentación del eje de la inflorescencia de la piña al utilizar granos de tибicos como inóculo.

3.9.2. Programas para el análisis de datos

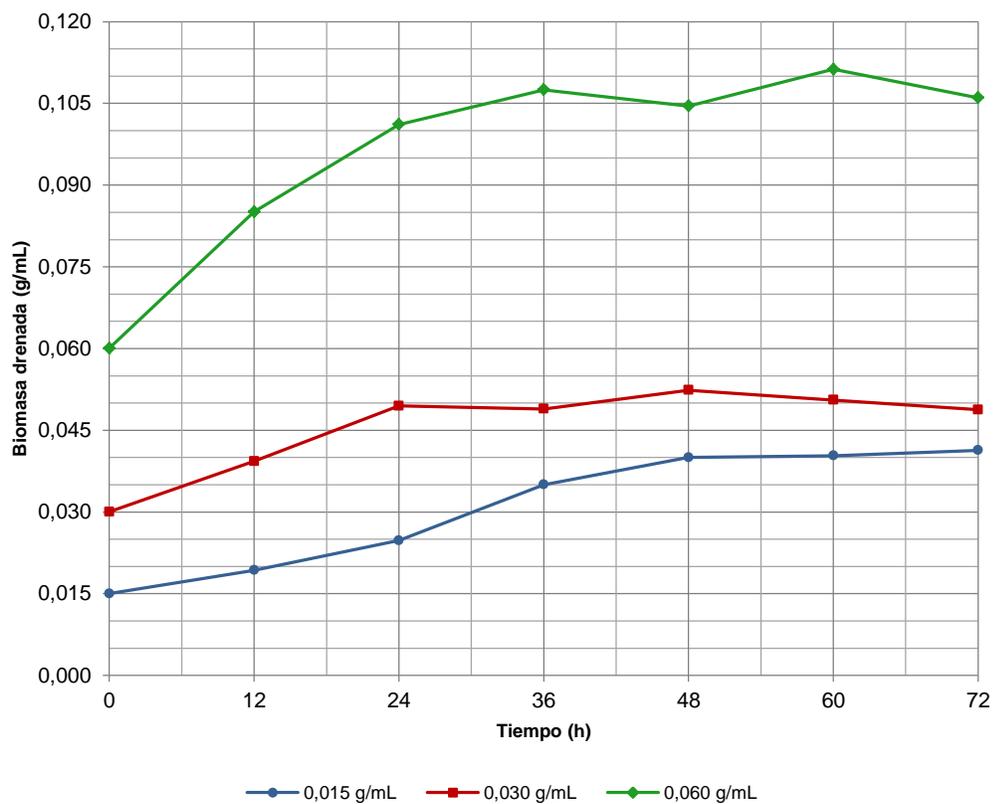
Se utilizó el sistema operativo Windows 7 Home Basic así como los siguientes programas:

- **Logger Pro Demo:** permitió ingresar datos, graficarlos y analizarlos
- **Microsoft Word:** permitió crear y editar documentos profesionales
- **Microsoft Excel:** permitió procesar, graficar y analizar información
- **Microsoft Visio:** permitió crear, editar y compartir diagramas.
- **Microsoft PowerPoint:** permitió crear y editar presentaciones.

4. RESULTADOS

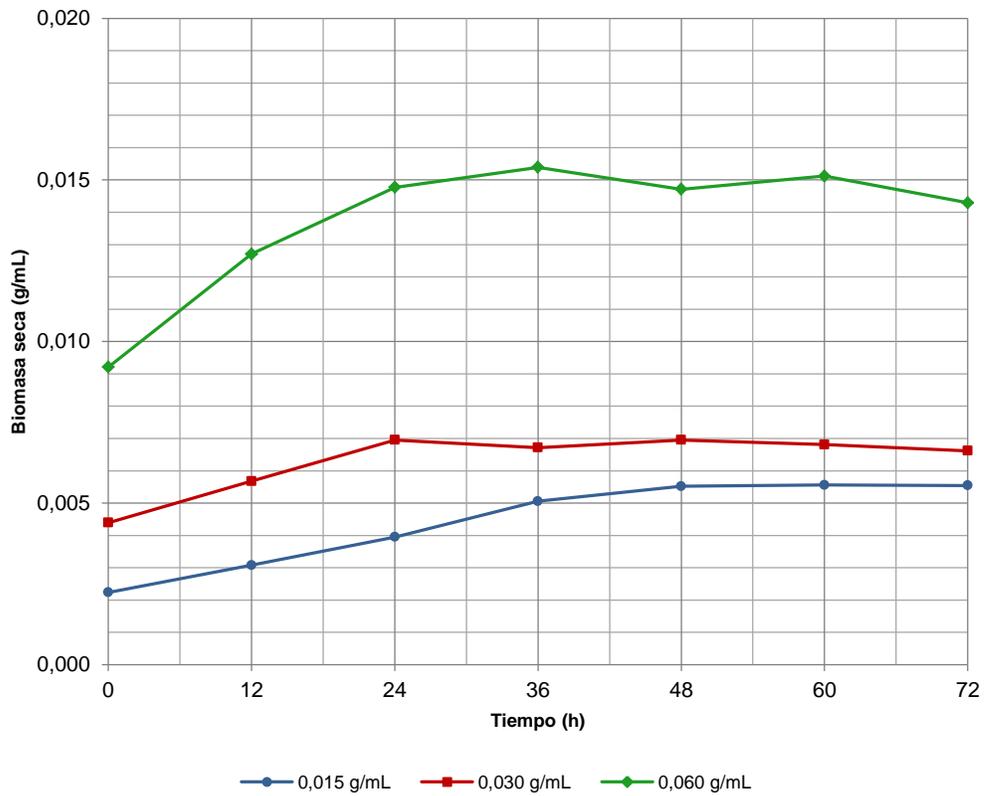
La información colectada y procesada con base en el diseño de investigación planteado, fue presentada gráficamente y complementada con las expresiones matemáticas que describen el patrón de su comportamiento.

Figura 24. **Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**



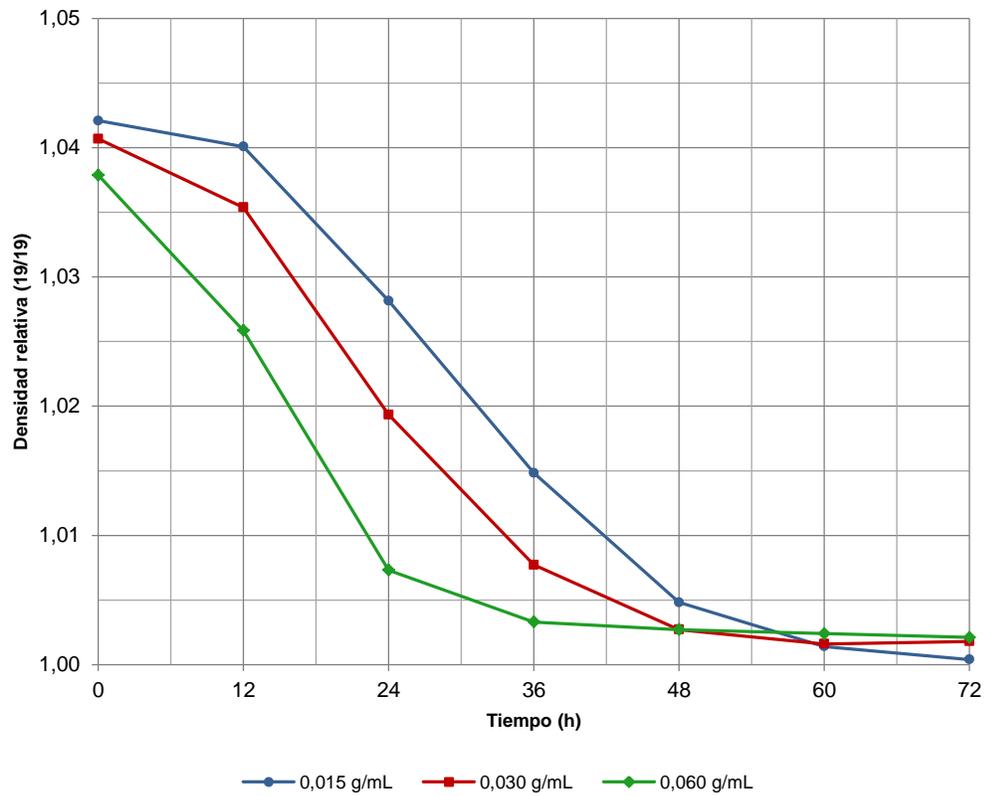
Fuente: elaboración propia.

Figura 25. **Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**



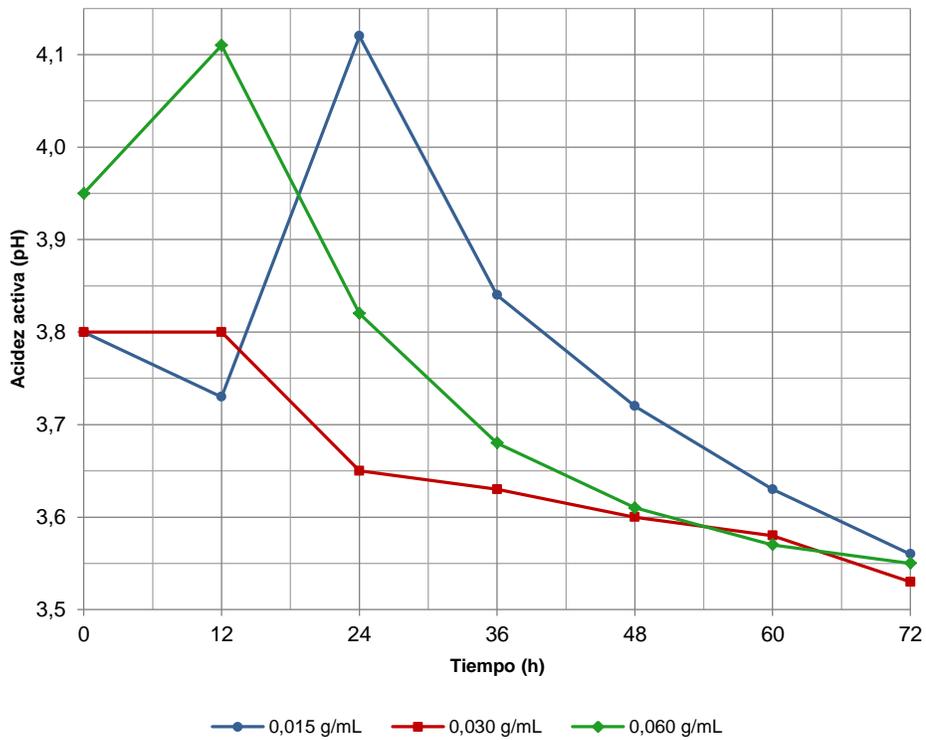
Fuente: elaboración propia.

Figura 26. **Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**



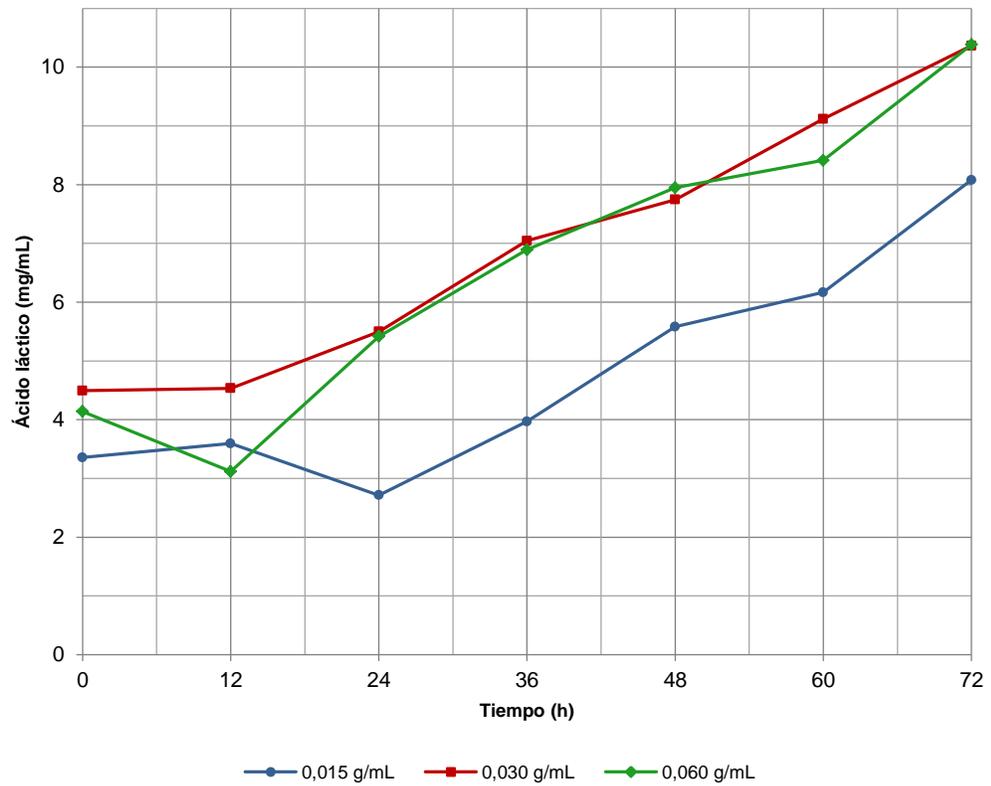
Fuente: elaboración propia.

Figura 27. **Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**



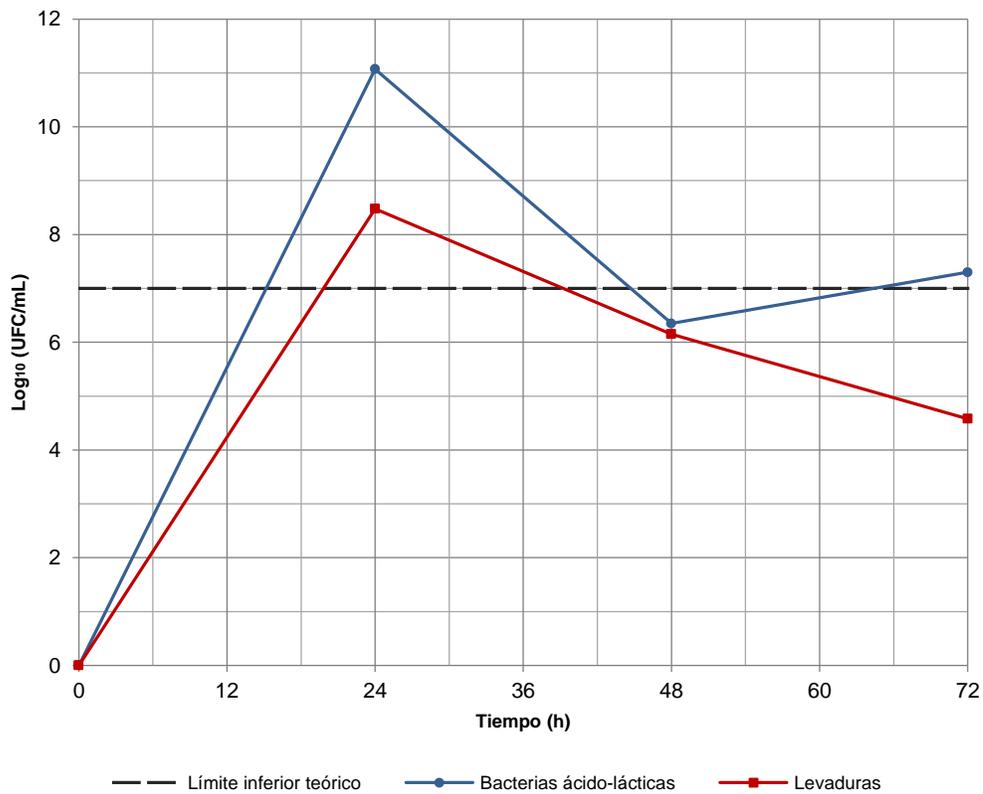
Fuente: elaboración propia.

Figura 28. **Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**



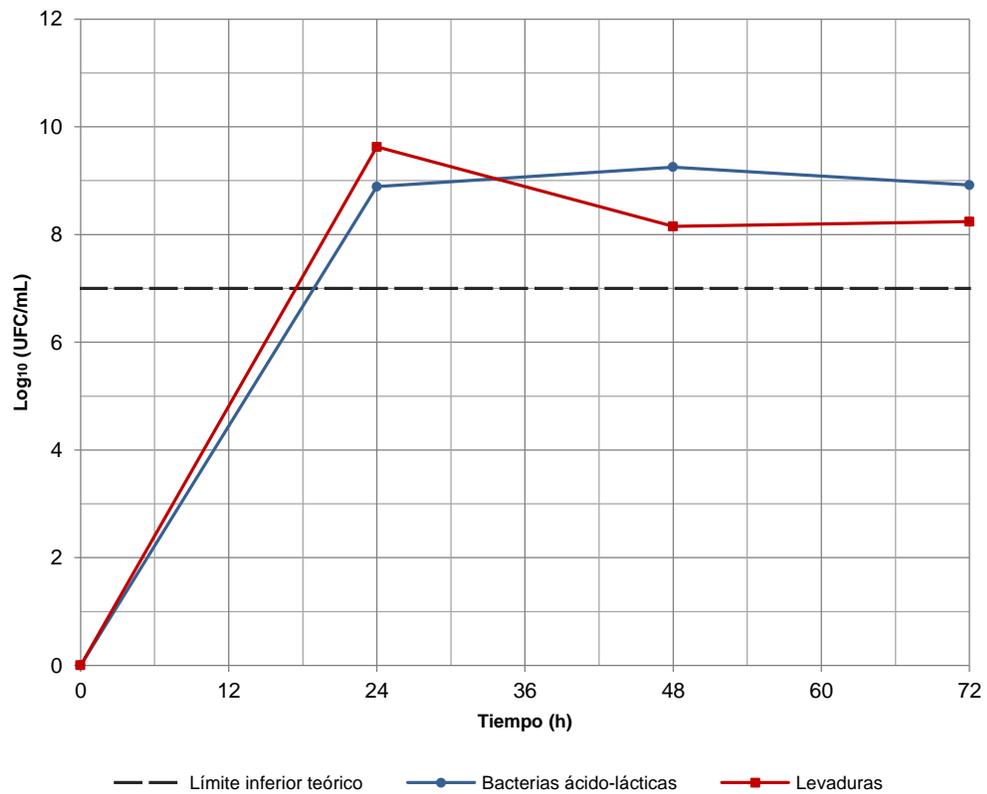
Fuente: elaboración propia.

Figura 29. Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,015 g/mL, en función del tiempo de fermentación



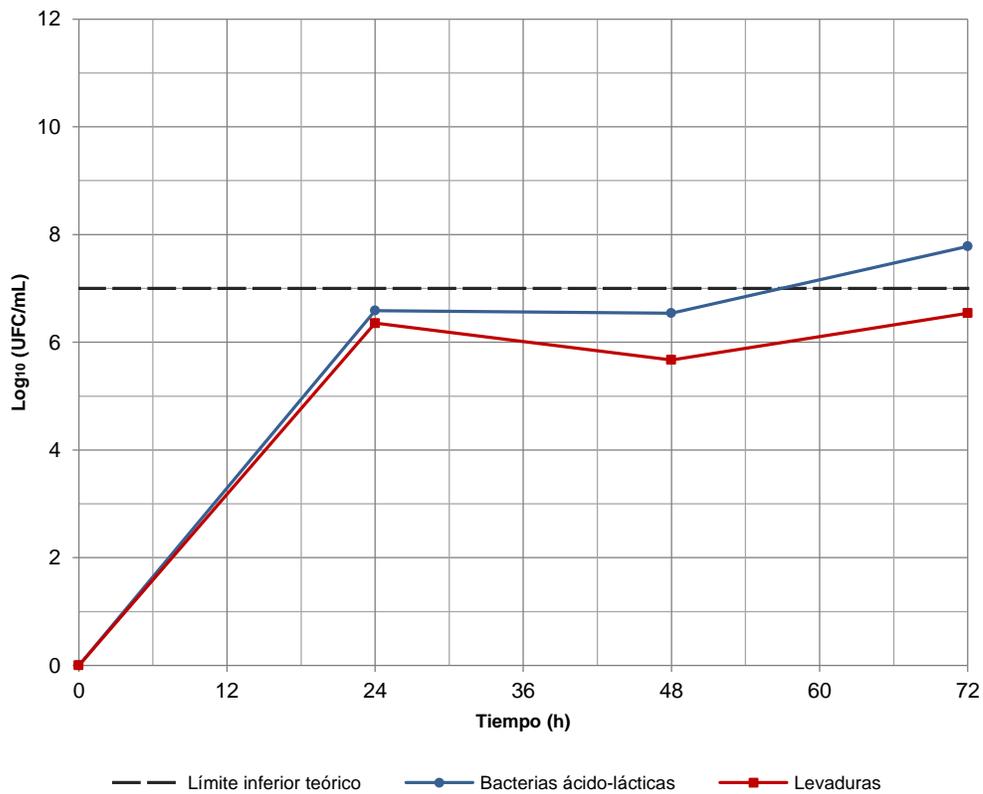
Fuente: elaboración propia.

Figura 30. **Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,030 g/mL, en función del tiempo de fermentación**



Fuente: elaboración propia.

Figura 31. **Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,060 g/mL, en función del tiempo de fermentación**



Fuente: elaboración propia.

Tabla XVII. **Expresiones matemáticas para la concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Línea	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
0,015		$m_d = 5E-09t^4 - 9E-07t^3 - 4E-05t^2 + 0,0002t + 0,0153$	0 – 72	0,9930
0,030		$m_d = 5E-10t^4 + 5E-09t^3 - 1E-05t^2 + 0,0011t + 0,0298$	0 – 72	0,9738
0,060		$m_d = -5E-09t^4 + 9E-07t^3 - 8E-05t^2 + 0,0030t + 0,0596$	0 – 72	0,9862

Fuente: elaboración propia.

Tabla XVIII. **Expresiones matemáticas para la concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Línea	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
0,015		$m_s = 5E-10t^4 - 8E-08t^3 + 4E-06t^2 + 3E-05t + 0,0023$	0 – 72	0,9974
0,030		$m_s = -3E-11t^4 + 2E-08t^3 - 3E-06t^2 + 0,0002t + 0,0044$	0 – 72	0,9668
0,060		$m_s = -4E-10t^4 + 1E-07t^3 - 1E-05t^2 + 0,0004t + 0,0092$	0 – 72	0,9871

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIX. **Expresiones matemáticas para la densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Línea	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
0,015		$\rho_r = -0,0002t + 1,0421$	0 – 12	1
		$\rho_r = -9E-09t^4 + 2E-06t^3 - 9E-05t^2 + 0,0010t + 1,0394$	12 - 72	0,9999
0,030		$\rho_r = -0,0004t + 1,0407$	0 – 12	1
		$\rho_r = -5E-09t^4 + 7E-07t^3 - 2E-05t^2 - 0,0014t + 1,0529$	12 - 72	0,9999
0,060		$\rho_r = -2E-05t^2 - 0,0007t + 1,0379$	0 – 24	1
		$\rho_r = 6E-09t^4 - 1E-06t^3 + 0,0001t^2 - 0,0037t + 1,0520$	24 – 72	1

Fuente: elaboración propia.

Tabla XX. **Expresiones matemáticas para la acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Línea	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
0,015		$pH = -0,0058t + 3,75$	0 – 12	1
		$pH = 0,0325t + 3,29$	12 – 24	1
		$pH = 2E-07t^4 - 5E-05t^3 + 0,0044t^2 - 0,1678t + 6,23$	24 – 72	1
0,030		$pH = 3,75$	0 – 12	1
		$pH = -0,0125t + 3,90$	12 – 24	1
		$pH = -1E-06t^3 + 0,0001t^2 - 0,0062t + 3,6980$	24 – 72	0,9941
0,060		$pH = 0,0133t + 3,90$	0 – 12	1
		$pH = 7E-08t^4 - 2E-05t^3 + 0,0014t^2 - 0,0608t + 4,6117$	12 – 72	1

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXI. **Expresiones matemáticas para la acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Línea	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
0,015		$L_{Ac} = 0,0198t + 3,3552$	0 – 12	1
		$L_{Ac} = -0,0733t + 4,4722$	12 – 24	1
		$L_{Ac} = 5E-05t^3 - 0,0066t^2 + 0,3952t - 3,6666$	24 – 72	0,9882
0,030		$L_{Ac} = 0,0034t + 4,493$	0 – 12	1
		$L_{Ac} = 6E-07t^4 - 1E-04t^3 + 0,0054t^2 - 0,0205t + 4,1352$	12 – 24	0,9954
0,060		$L_{Ac} = -0,0851t + 4,1374$	0 – 12	1
		$L_{Ac} = 2E-06t^4 - 2E-04t^3 + 0,0081t^2 + 0,0774t + 1,3844$	12 – 72	0,9990

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXII. **Expresiones matemáticas para las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,015 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Organismos	Color	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
Bacterias ácido-lácticas		$BAL_{log} = 0,4614t$	0 – 24	1
		$BAL_{log} = 0,0049t^2 - 0,5516t + 21,4730$	24 – 72	1
Levaduras		$L_{Log} = 0,3532t$	0 – 24	1
		$L_{Log} = 0,0007t^2 - 0,1440t + 11,5570$	24 – 72	1

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIII. **Expresiones matemáticas para las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,030 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Organismos	Color	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
Bacterias ácido-lácticas		$BA_{Log} = 0,3704t$	0 – 24	1
		$BA_{Log} = 0,0011t^2 - 0,0825t + 7,924$	24 – 72	1
Levaduras		$L_{Log} = 0,4012t$	0 – 24	1
		$L_{Log} = 0,0014t^2 - 0,1594t + 12,670$	24 – 72	1

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIV. **Expresiones matemáticas para las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,060 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Organismos	Color	Ecuación	Intervalo (h)	R ²
Bacterias ácido-lácticas		$BA_{Log} = 0,2745t$	0 – 24	1
		$BA_{Log} = -0,0006t^2 + 0,0588t + 7,827$	24 – 72	1
Levaduras		$L_{Log} = 0,2648t$	0 – 24	1
		$L_{Log} = 0,0013t^2 - 0,1256t + 8,5920$	24 – 72	1

Fuente: elaboración propia.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La presente investigación consistió en evaluar a nivel de laboratorio la capacidad fermentativa de los granos de tибicos al utilizar el jugo del eje de la inflorescencia de la piña como sustrato único, para su aprovechamiento como posible bebida probiótica.

Dicha evaluación se llevó a cabo a través de la fermentación de doscientos mililitros de sustrato previamente acondicionado con tres diferentes concentraciones de inóculo, durante setenta y dos horas, dentro de sistemas abiertos, sin agitación, y a temperatura constante de treinta grados Celsius. Asimismo, se cuantificaron diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos, en función de la concentración de granos de tибicos inoculados y del tiempo de fermentación.

Con base en el objetivo 1, la biomasa drenada se expresó en términos de concentración respecto al volumen total del medio. Este parámetro representa a la biomasa real manipulada en los procesos de fermentación, la cual posee un elevado contenido de humedad debido a las características físicas de los granos de tибicos y a que el exceso de líquido fue separado por gravedad.

Los datos de la tabla XLVII fueron expresados a través la figura 24, la cual muestra la concentración de la biomasa drenada en función del tiempo de fermentación. Dichas curvas exhibieron un comportamiento similar a las curvas que representan a la concentración de la biomasa seca (figura 25), pudiendo observarse en ambas que el crecimiento de la biomasa respecto al tiempo de fermentación, fue dependiente de la cantidad de inóculo.

Asimismo, pudo observarse un desplazamiento vertical positivo en función del tiempo de fermentación en las curvas de la concentración de la biomasa drenada respecto a las curvas de la concentración de la biomasa seca.

Este desplazamiento se generó por el incremento del contenido de agua en los granos de tибicos, debido a que conforme los granos aumentaron en número y tamaño, también aumentó la cantidad de líquido retenida en la superficie, el interior, y en los espacios intersticiales de estos.

Además, dicho incremento se produjo en forma variable respecto al tiempo de fermentación, por lo que no fue posible correlacionar la concentración de la biomasa drenada con la concentración de la biomasa seca.

Por lo tanto, para analizar correctamente el comportamiento de los granos de tибicos durante la fermentación, fue necesario excluir la influencia de la humedad en los mismos.

El objetivo 2 fue expresado gráficamente a través de la figura 25, con base en los datos de la tabla XLVIII, mostrando así a las curvas de la concentración de la biomasa seca en función del tiempo de fermentación.

Dichas curvas presentaron un comportamiento que se ajustó al modelo teórico del desarrollo microbiológico, pudiendo observarse en la mayoría de estas cuatro etapas: crecimiento, desaceleración, estabilización, y declinación.

Al inicio de los procesos de fermentación se observó un período de incremento sostenido en las curvas de la concentración de la biomasa seca, denominado como fase de crecimiento. No obstante, esta fase finalizó a las 36 horas de fermentación al inocular el medio en proporción de 0,015 gramos por

mililitro, a las 24 horas al inocular en proporción de 0,030 gramos por mililitro, y a las 12 al inocular en proporción de 0,060 gramos por mililitro.

Al finalizar la etapa de crecimiento, se pudo observar una fase de desaceleración, la cual tuvo una duración de 12 horas al inocular en proporciones de 0,015 y 0,060 gramos por mililitro. Sin embargo, no se pudo apreciar esta fase al inocular en proporción de 0,030 gramos por mililitro.

Seguido a la etapa de desaceleración, las curvas exhibieron un período de máximo crecimiento, en el cual no aumentó o disminuyó considerablemente la concentración de la biomasa seca, denominado como “fase estacionaria”.

Al inocular en proporción de 0,015 gramos por mililitro, la fase de estacionaria tuvo una duración de 24 horas, alcanzando la máxima concentración de biomasa seca de 0,0154 gramos por mililitro a las 36 horas; al inocular en proporción de 0,030 gramos por mililitro esta fase tuvo una duración de 36 horas, alcanzando la máxima concentración de biomasa seca de 0,0070 gramos por mililitro a las 24 y 48 horas; y al inocular en proporción de 0,060 gramos por mililitro esta fase se prolongó durante 24 horas, alcanzando la máxima concentración de biomasa seca de 0,0056 gramos por mililitro a las 60 horas de fermentación.

Finalmente, y posterior a la fase estacionaria, se observó un período en el cual se redujo la concentración de la biomasa seca, denominado como fase de declinación. Dicha fase tuvo una duración de 12 horas al inocular en proporción de 0,030 gramos por mililitro, y una duración de 24 horas al inocular en proporción de 0,060 gramos por mililitro, mientras que no se pudo observar dicha fase dentro de las 72 horas de fermentación al inocular en proporción de 0,015 gramos por mililitro.

La amplitud de los modelos de desarrollo microbiológico respecto al tiempo de fermentación, manifestados en las curvas de la concentración de la biomasa seca, reflejaron una relación inversamente proporcional a la cantidad de inóculo.

Esto se debe a que, a mayor proporción de microorganismos, mayor es la velocidad a la cual los nutrientes presentes en el sustrato son metabolizados, así como también es mayor la velocidad a la cual los subproductos son acumulados en el medio fermentado.

Además, no se observó la denominada fase de latencia en las curvas de la concentración de la biomasa drenada ni en las curvas de la concentración de la biomasa seca, habiendo logrado suprimirla o reducirla a un período menor de 12 horas, debido al acondicionamiento previo del inóculo bajo las mismas condiciones experimentales.

Respecto al objetivo 3, la densidad relativa del medio fermentado se determinó relacionando las masas de volúmenes iguales de muestra y de agua desmineralizada, por medio de un picnómetro, a una temperatura ambiente promedio de diecinueve grados Celsius.

Los datos de la tabla XLIX fueron expresados a través de la figura 26, la cual muestra la densidad relativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña en función del tiempo de fermentación.

La densidad relativa inicial del medio no fue igual debido a que la empresa a través de la cual se obtuvo la materia prima, procesa la piña con un contenido superior a 8 grados Brix.

No obstante, el valor inicial de la densidad relativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña fue de $1,040 \pm 0,002$, alcanzando al final de los procesos de fermentación un valor de $1,001 \pm 0,001$, reflejando una concentración de sustrato fermentable de $0,039 \pm 0,003$ gramos por mililitro.

Esta pérdida de masa por unidad de volumen del jugo del eje de la inflorescencia de la piña fue ocasionada por el metabolismo de los microorganismos, al transformar los nutrientes contenidos sustrato y transferir dicha masa hacia sus productos y subproductos, hacia sus estructuras celulares, y hacia la matriz de polisacáridos que conforma los granos de tibicos.

Por otro lado, el medio inoculado en proporción de 0,015 gramos por mililitro no reflejó un valor constante en la densidad relativa respecto al tiempo de fermentación dentro de las 72 horas del proceso, mientras que al inocular el medio en proporción de 0,030 gramos por mililitro se presentó un valor constante a partir de las 60 horas, y al inocular el medio en proporción de 0,060 gramos por mililitro este valor se presentó a partir de las 48 horas.

Dichas etapas, indicaron la finalización del proceso de fermentación, asumiendo que los principales nutrientes en el sustrato habían sido consumidos en su totalidad, coincidiendo exactamente con las etapas de declinación observadas en las curvas de la concentración de la biomasa seca (figura 25).

Además, pudo observarse que la tasa de disminución de la densidad relativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, respecto al tiempo de fermentación, fue directamente proporcional a la cantidad de inóculo.

Por lo tanto, la proporcionalidad directa de la reducción de la densidad relativa hacia un valor constante, respecto al tiempo de fermentación, indica que mientras mayor sea la cantidad de microorganismos inoculados, más rápido es el consumo de los nutrientes del medio.

El objetivo 4 fue expresado gráficamente a través de la figura 27, con base en los datos de la tabla L, mostrando así a la acidez activa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña respecto al tiempo de fermentación.

Como se puede observar en dicha figura, la acidez activa inicial del medio tuvo un valor de $3,80 \pm 0,08$, alcanzando al final de los procesos de fermentación un pH de $3,50 \pm 0,02$. No obstante, estas curvas no mostraron una evolución similar en el período de las primeras 24 horas.

En dicho período, el jugo del corazón de la piña inoculado en proporciones de 0,015 y 0,060 gramos por mililitro, exhibió un incremento en el pH hasta un valor de $4,06 \pm 0,01$, en donde el primer medio inoculado lo alcanzó a las 24 horas y el segundo medio inoculado lo alcanzó a las 12 horas de fermentación, respectivamente.

Por otro lado, el jugo del corazón de la piña inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro no exhibió un descenso en la acidez, sino que a las 12 horas de fermentación mantuvo el mismo pH que al inicio del proceso de fermentación.

Dado el comportamiento de la acidez activa en los medios fermentados con dos de las tres proporciones de inóculo, se considera que el medio inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro haya tenido también un incremento en el pH dentro de las primeras veinticuatro horas de fermentación.

La principal influencia en la respuesta de la acidez activa es la excreción y acumulación de ácidos orgánicos en el medio, producto de la conversión por parte de los microorganismos de la fuente de carbono suministrada en exceso. No obstante, cuando dicha fuente de carbono se vuelve limitada, los ácidos orgánicos pueden ser consumidos.

Asimismo, el incremento del pH pudo ser el resultado de los procesos de degradación o consumo, ya que la degradación proteolítica puede resultar en la liberación de amonio en el medio, generando el efecto descrito. ⁽¹⁾

Consecutivamente, el objetivo 5 se refiere a la acidez total titulable, la cual representa a la cantidad total de ácidos contenidos en el medio fermentado. Sin embargo, debido a que este parámetro no puede diferenciar entre las especies individuales presentes, el resultado se expresó como su equivalente en el ácido predominante, el ácido láctico.

Este parámetro fue el único que no fue cuantificado en duplicado, ya que, la acidez total titulable de la segunda titulación se vio afectada por la continuidad de la actividad microbiológica durante el período demorado al realizar la primera titulación, dando como resultado un valor incorrecto.

A pesar de que el ácido láctico fue utilizado para expresar el resultado, el medio fermentado posee además otros compuestos, correspondientes tanto al sustrato como a los generados por el metabolismo de los microorganismos.

Debido a la presencia de burbujas de CO₂, las cuales aumentaron en función del tiempo de fermentación, se considera que el jugo fermentado contiene ácido carbónico, formado al solubilizarse el gas en el medio acuoso.

¹ *Practical fermentation* technology. MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. (eds). p. 243.

El dióxido de carbono es generado por las levaduras y las bacterias heterolácticas al metabolizar los azúcares a alcohol, estas últimas a través de la ruta fosfoacetolasa producen ácido láctico, etanol y CO₂.

La figura 28, basada en los datos de la tabla LI, muestra la acidez total titulable en función del tiempo de fermentación. En dicha figura se pudo observar que, al igual que las curvas de la acidez activa, las curvas de la acidez total titulable no exhibieron un comportamiento similar durante las primeras 24 horas de fermentación.

En este período se vio reflejado incremento en el valor del pH de los medios inoculados en proporciones de 0,015 y 0,060 gramos por mililitro en el descenso del valor de la acidez total titulable, a las 24 y 12 horas de fermentación, respectivamente.

De igual forma, el medio inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro exhibió un valor constante de la acidez total titulable durante las primeras 12 horas de fermentación, al igual que el comportamiento mostrado en el valor de la acidez activa.

Las curvas de la acidez total titulable manifestaron una evolución similar en el intervalo de las 24 a las 72 horas de fermentación. En dicho período los medios inoculados en proporciones de 0,030 y 0,060 gramos por mililitro no mostraron una diferencia significativa en el valor de la acidez total titulable, alcanzando ambos medios un valor equivalente a $10,37 \pm 0,01$ miligramos por mililitro de ácido láctico al final del proceso de fermentación; mientras que el medio inoculado en proporción de 0,015 gramos por mililitro alcanzó un valor equivalente a 8,08 miligramos por mililitro de ácido láctico al final del proceso de fermentación.

Para que un alimento sea considerado como probiótico, este debe de ser sometido a diversos estudios, entre los que se encuentran la identificación de las cepas presentes y la cuantificación de los microorganismos viables correspondientes a cada una de ellas.

En el presente estudio no se contabilizó cada cepa como tal, sino que se procedió al recuento de los grupos totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras a través de métodos de cultivo selectivos, para determinar si la concentración de estos es lo suficientemente elevada para considerar la posibilidad de que el jugo del eje de la inflorescencia de la piña fermentado sea un alimento probiótico.

Dichos parámetros fueron cuantificados a intervalos de veinticuatro horas, es decir a las 0, 24, 48 y 72 horas de fermentación. Esto debido a que, por el horario de atención del Laboratorio de Microbiología de la FMVZ, las muestras correspondientes a las 12, 36 y 60 horas debían permanecer doce horas en refrigeración, aumentando así la probabilidad de obtener un resultado incorrecto.

Por otro lado, para simplificar los datos y poder visualizar de mejor forma el comportamiento de los microorganismos viables suspendidos en el medio durante la fermentación, los resultados fueron expresados en términos del logaritmo de base diez de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (Log_{10} UFC/mL).

El Objetivo 6 fue expresado gráficamente a través de las figuras 29, 30 y 31, con base en los datos de las tablas LII, LIII y LIV, respectivamente. Tales figuras muestran a las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras respecto al tiempo de fermentación.

La figura 29 muestra el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,015 gramos por mililitro, en función del tiempo de fermentación.

En este diagrama se observa que dichos microorganismos no mantuvieron una concentración estable superior al límite inferior teórico de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro ⁽²⁾, durante el proceso de fermentación, para considerar al jugo como como posible alimento probiótico, en donde las bacterias ácido-lácticas superaron este límite a las 24 y a las 72 horas, mientras que las levaduras lo superaron únicamente a las 24 horas.

Por otro lado, las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables mostraron un descenso considerable en sus poblaciones a partir del punto máximo alcanzado a las 24 horas de fermentación. Este comportamiento es inverso al observado en el modelo de desarrollo microbiológico del medio inoculado en proporción de 0,015 gramos por mililitro.

La figura 30 muestra el recuento de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro, en función del tiempo de fermentación. En este diagrama se observa que las poblaciones de ambos microorganismos mantuvieron una concentración estable, y relativamente constante, superior al límite inferior teórico de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, en el intervalo de las 24 a las 72 horas de fermentación, para considerar al jugo fermentado como posible alimento probiótico.

² *Handbook of fermented functional foods*. FARNWORTH, Edward R. (ed.). p. 26.

El comportamiento relativamente constante de las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras suspendidas en el medio inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro, indica una adecuada relación entre la concentración inicial de dichos microorganismos y la concentración de sustrato fermentable en el jugo del eje de la inflorescencia de la piña.

La figura 31 muestra el recuento de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro, en función del tiempo de fermentación. En este diagrama se observa que estos microorganismos no mantuvieron una concentración estable, en el proceso de fermentación, superior al límite inferior teórico de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro para considerar al jugo fermentado como posible alimento probiótico, en donde únicamente las bacterias ácido-lácticas superaron este límite a las 72 horas.

Por otro lado, las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables exhibieron un comportamiento similar, con una tendencia a incrementar sus poblaciones en función del tiempo de fermentación. Este comportamiento es inverso al observado en el modelo de desarrollo microbiológico del medio inoculado en proporción de 0,060 gramos por mililitro.

Con base en la elevada concentración de levaduras en el medio fermentado, se considera que el dióxido de carbono liberado durante el proceso de fermentación corresponde principalmente al metabolismo de estos microorganismos.

Asimismo, al comparar las poblaciones de microorganismos viables, se puede decir en términos generales que el jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con las tres proporciones de granos de tибicos mantiene una mayor concentración de bacterias ácido-lácticas respecto a las levaduras, concordando con lo expresado en la literatura.

Además, con base en los resultados, se deduce que la fermentación no ocurrió únicamente en la proximidad de los granos de tибicos, sino en todo el medio, debido a la difusión de los microorganismos, nutrientes y subproductos por medio del flujo generado por la acción ascendente de las burbujas de gas.

Por otro lado, según los datos obtenidos de los análisis de varianza (tablas LIII a LIX) efectuados a los diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos utilizados para el cumplimiento del objetivo principal de esta investigación, se puede observar que las variaciones de todos estos parámetros respecto a las variables independientes son tan grandes que no se pueden asociar a variaciones aleatorias.

Debido a que la acidez total titulable no fue cuantificada en duplicado, no se pudo analizar estadísticamente por medio del ANOVA, su interacción respecto a la variación del inóculo y al tiempo de fermentación.

Sin embargo, los valores estadísticos asociados a las interacciones del resto de parámetros respecto a las variables independientes son tan grandes que tampoco pueden ser asociadas a variaciones aleatorias.

Por lo tanto, quedan rechazadas todas las hipótesis nulas (H_0), y se aceptan como verdaderas todas las hipótesis alternativas (H_1).

CONCLUSIONES

1. Fue posible evaluar a nivel de laboratorio la capacidad de fermentación de los granos de tибicos utilizando como sustrato único el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (*Ananas comosus*) proveniente de los subproductos de la industria alimenticia, para ser aprovechado como posible bebida probiótica, bajo el diseño experimental planteado.
2. La cantidad de agua retenida en los granos de tибicos aumentó de forma variable en función del tiempo de fermentación, por lo que la concentración de la biomasa drenada no se correlacionó con la concentración de la biomasa seca.
3. El aumento de la concentración de la biomasa drenada y de la concentración de la biomasa seca, respecto al tiempo de fermentación, fue dependiente de la cantidad de inóculo.
4. Las curvas de la concentración de la biomasa seca en función del tiempo de fermentación, se ajustaron al modelo teórico del desarrollo microbiológico.
5. La amplitud de los modelos de desarrollo microbiológico en función del tiempo de fermentación, reflejaron una relación inversamente proporcional a la cantidad de inóculo.

6. La densidad relativa inicial del jugo del eje de la inflorescencia de la piña tuvo un valor de $1,040 \pm 0,002$, alcanzando al final de los procesos de fermentación un valor de $1,001 \pm 0,001$, reflejando una concentración de sustrato fermentable de $0,039 \pm 0,003$ gramos por mililitro.
7. La tasa de disminución de la densidad relativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, en función del tiempo de fermentación, fue directamente proporcional a la cantidad de inóculo.
8. Los períodos en los cuales la densidad relativa de jugo del eje de la inflorescencia de la piña descendió hasta un valor constante, en función del tiempo de fermentación, coincidieron con las etapas de declinación en los modelos de desarrollo microbiológico.
9. La acidez activa inicial del jugo del eje de la inflorescencia de la piña tuvo un valor de $3,80 \pm 0,08$, alcanzando al final de los procesos de fermentación un pH de $3,5 \pm 0,02$.
10. El jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado en proporciones de 0,015 y 0,060 gramos por mililitro, exhibió un incremento en el valor del pH y un descenso en el valor de la acidez total titulable, a las 24 y 12 horas de fermentación, respectivamente, como resultado de procesos proteolíticos según la literatura.
11. Las curvas de la acidez total titulable en función del tiempo de fermentación manifestaron una evolución similar en el intervalo de las 24 a las 72 horas, período en el cual no existió una diferencia significativa del valor de dicho parámetro en el jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado en proporciones de 0,030 y 0,060 gramos por mililitro.

12. El jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado en proporción de 0,030 gramos por mililitro, se considera como posible bebida probiótica en el intervalo de las 24 a las 72 horas de fermentación, con base en las concentraciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con granos de tibicos en proporción de 0,030 gramos por mililitro para obtener una posible bebida probiótica con base en el valor mínimo de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro, bajo diversas temperaturas de incubación.
2. Evaluar la capacidad fermentativa de los granos de tibicos mediante el uso de diluciones del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, así como las propiedades organolépticas del producto fermentado.
3. Evaluar la capacidad fermentativa de los granos de tibicos mediante el uso de otros sustratos provenientes de los subproductos generados en la industria.
4. Identificar y cuantificar las cepas de los microorganismos presentes en los granos de tibicos utilizados a nivel artesanal en la ciudad de Guatemala y otras regiones del país, para determinar el contenido de microorganismos probiótico y el grado de contaminación en los mismos.
5. Evaluar la purificación y conservación de los granos de tibicos para su transporte y comercialización.
6. Evaluar la fermentación del jugo del eje de la inflorescencia de la piña mediante el uso de granos de tibicos en un proceso continuo.

7. Evaluar otras aplicaciones industriales para la fibra separada del eje de la inflorescencia de la piña.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGRONET. *Aspectos generales de la piña* [en línea]. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. <http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Aspectos%20generales%20de%20la%20pina.pdf> [Consulta: 10 de febrero de 2012].
2. BAMFORTH, Charles W. *Food, fermentation and micro-organisms*. USA: Blackwell Science, 2005. 216 p.
3. BARAONA COCKRELL, Marcia; SANCHO BARRANTES, Ellen. “La piña”. En: *Piña y papaya, fruticultura especial 3*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, 1998. p. 17-43.
4. BOETIUS, Marco. *Kombuchapilz* [en línea]. Alemania. <<http://www.kombuchapilz.de/english/waterkefirhistory.htm>> [Consulta: 03 de marzo de 2012].
5. DE LAS CAGIGAS REIG, Ada Lydia; BLANCO ANESTO, Jorge. “Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa”. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, vol. 16, núm. 1, 2002, p. 63-68.
6. DIAS CARLIER, Jorge; COPPENS D’EECKENBRUGGE, Geo; LEITAO, José Manuel. “Pineapple”. En: KOLE, Chittaranjan (ed.). *Genome mapping and molecular breeding in plants*. vol. 4: Fruits and nuts. Alemania: Springer-Verlag, 2007. 370 p.

7. DOLMAR. *Análisis en vinos DOLMAR* [en línea]. Productos de laboratorio. <http://www.dolmarproductos.com/sites/default/files/dolmar_analisis_vinos.pdf> [Consulta: 04 de octubre de 2012].
8. *Fermented foods and beverages of the world*. PRAKASH TAMANG, Jyoti; KAILASAPATHY, Kasipathy (eds.). USA: Taylor and Francis Groups, 2010. 434 p.
9. *Food Analysis*. NIELSEN, S. Suzanne (ed.). 4a ed. USA: Springer Science + Business Media, 2010. 602 p.
10. FORSYTHE, Stephen J.; HAYES, P. R. *Food hygiene, microbiology and haccp*. 3a ed. Maryland, USA: Aspen Publishers, 1988. 449 p.
11. GARCÍA BARCELÓ, Juan. *Técnicas analíticas para vinos*. Barcelona: GAB, 1990. 644 p.
12. GODOY, Augusto; HERRERA, Teófilo; ULLOA, Miguel. *Más allá del pulque y el tepache, bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. México: Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003. 109 p.
13. GOLDMAN, Emanuel; GREEN, Lorrence H. *Practical Handbook of Microbiology*. USA: Taylor and Francis Group, 2009. 853 p.
14. GUIDO, Maritza; et al. *La piña*. Nicaragua: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1983. 20 p.

15. GULITZ, Anna; et al. "The microbial diversity of water kefir". *International Journal of Food Microbiology*, vol. 151, num. 3, 2011. p. 284-288.
16. *Handbook of fermented functional foods*. FARNWORTH, Edward R. (ed.). 2a ed. USA: Taylor & Francis Group, 2008. 581 p.
17. *Handbook of probiotics and prebiotics*. LEE, Yuan Kun; SALMINEN, Seppo (eds.). 2a ed. USA: John Wiley & Sons, 2009. 596 p.
18. HARRIS, Daniel C. *Quantitative chemical analysis*. 7a ed. USA: W. H. Freeman and Company, 2003. 663 p.
19. HERNÁNDEZ PEÑARANDA, Alicia. *Microbiología industrial*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, 2003. 266 p.
20. HUTKINS, Robert Wayne. *Microbiology and technology of fermented foods*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2006. 473 p.
21. International Organization for Standardization. *Fruit and vegetable products: determination of titratable acidity*. ISO 750:1998(E). Suiza: ISO, 1998. 4 p.
22. JAY, James M.; LOESSNER, Martin J; GOLDEN, David A. *Modern food microbiology*. 7a ed. USA: Springer Science + Business Media, 2005. 790 p.

23. KETNAWA, Sunantha; CHAIWUT, Phanopong; RAWDKUEN, Saroat. "Pineapple wastes: a potential source from bromelain extraction" [en línea]. vol 90, num. 3, [ref. July 2012]. *Food and Bioprocess Technology*. Disponible en web: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308511001143>>.
24. MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. *Biología de los microorganismos*. 10a ed. Madrid: Pearson Educación, 2003. 1011 p.
25. MCKELLAR, Robin C.; LU, Xuewen. "Primary models". En: *Modeling microbial responses in food*. USA: CRC Press, 2004, p. 21-62.
26. *Merck microbiology manual*. 12 ed. Germany: Merck, 200?. 688 p.
27. MIGUEL, Maria Gabriela da C. P.; et al. "Profile of microbial communities present in tibioco (sugary kéfir) grains from different Brazilian States" [en línea]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, num. 8. [ref. August 2011], p. 1875-1884. Disponible en web: <<http://rd.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0646-6/fulltext.html#Sec8>>.
28. MILLER, James N.; MILLER, Jane C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4a ed. Madrid: Pearson Educación, 2002. 278 p.

29. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Dirección de Planeamiento. *El Agro en Cifras 2011* [en línea]. <<http://www2.maga.gob.gt/portal.maga.gob.gt/portal/page/portal/2010/2012/PDFs/elagroencifras.pdf>> [Consulta: 05 de marzo de 2012].
30. MOINAS, Marielise; HORISBERGER, Marck; BAUER, Heinz. "The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy". *Archives of Microbiology*, vol 128, num. 2, December 1980. p. 157-161.
31. MONTGOMERY, Douglas C. *Diseño y análisis de experimentos*. 2a ed. México: Limusa, 2004. 686 p.
32. MORALES, Albert Ronald. *Frutoterapia: nutrición y salud*. 2a ed. Buenos Aires: Edaf del Plata, 2007. 256 p.
33. MORIN, Charles. *Cultivo de cítricos*. Costa Rica: IICA, 1980. 598 p.
34. NAVIDI, William. *Statistics for engineers and scientists*. 3a ed. USA: McGraw-Hill, 2011. 912 p.
35. NELSON, David L.; COX, Michael M. *Lehninger: principles of biochemistry*. 4a ed. USA: W. H. Freeman & Company, 2004. 1119 p.
36. *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*. HORWITZ, William (ed.). 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC INTERNATIONAL, 2000. Official method 970.90.

37. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *Producción acerca de: piña tropical* [en línea]. FAO. <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> [Consulta: 05 de marzo de 2012].
38. OKAFOR, Nduka. *Modern industrial microbiology and biotechnology*. India: Science Publishers, 2007. 530 p.
39. PEÑA PÉREZ, Luis Manuel; BECERRA SANTIAGO, Luis Omar. “Impacto de la nueva fórmula de la densidad del aire CIPM-2007” [en línea]. En: *Simposio de metrología 2010*. Centro Nacional de Metrología: México, [ref. 2010]. 5 p. Disponible en web: <<http://www.cenam.mx/sm2010/info/pmiercoles/sm2010-mp03a.pdf>>.
40. PHARMACOSMOS. *Dextran Chemistry* [en línea]. <<http://www.dextran.net/dextran-chemistry.html>> [Consulta: 06 de septiembre de 2012].
41. PIDUOX, M. “The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel” [en línea]. *MIRCEN Journal*, vol 5. num. 2, [ref. 1989], p. 223-238. <<http://www.springerlink.com/content/k5n5754r5l203h5u/>>.
42. PORRAS, Flor Dinorah. *Método de recuento en placa de hongos y bacterias*. Procedimiento operacional estándar. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de Microbiología, 2012. 3 p.

43. *Practical fermentation technology*. MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. (eds.). England: John Wiley & Sons, 2008. 402 p.
44. PRESCOTT, Lansing M.; KLEIN, Donald A.; HARLEY, John P. *Microbiology*. 5a ed. USA: McGraw-Hill, 2002. 1026 p.
45. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. FRAISE, Adam P.; LAMBERT, Peter A.; MAILLARD, Jean-Yves (eds.). 4a ed. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004. 678 p.
46. *Reglamento técnico centroamericano: cantidad de producto en preempacados*. Guatemala: MINECO; CONACYT; MIFIC; SIC; MEIC, 2006. 22 p.
47. RINZLER, Carol Ann. *The new complete book of food*. 2a ed. USA: Infobase Publishing, 2009. 474 p.
48. RUBIO, M. Teresa; et al. "Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos" [en línea]. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 35, núm. 1, [ref. 1993], p. 19-31. Disponible en web: <<http://132.248.9.1:8991/hevila/pdf-ariel/Estudio%20microbiano%20y%20quimico%20de%20la%20fermentacion%20de%20soluciones%20de%20piloncillo...pdf>>.

49. SANDERS, Mary Ellen. "Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health" [en línea]. *The Journal of Nutrition*, vol. 130, num. 2, [ref. February 1, 2000], p. 384S-390S. Disponible en web: <<http://jn.nutrition.org/content/130/2/384.full.pdf+html?sid=108cf1d4-1427-431c8b7a7be6ef389a79>>.
50. SANTANA PORBÉN, Sergio. "Los probióticos en la práctica médica: razones para su uso". *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, vol. 19, núm. 1, 2009. p 124-132.
51. SCHNEEDORF, José Mauricio. "Kefir d'aqua and its probiotic properties". En: *Probiotic in animal*. RIGOBELLO, Everlon Cid (ed.). Croatia: InTech, 2012. 272 p.
52. SHAFIUR RAHMAN, Mohammad. *Handbook of food preservation*. 2a ed. USA: Taylor & Francis Group, 2007. 1068 p.
53. *Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas*. KADER, Adel A. (ed.). Davis, California: Universidad de California, 2011. 584 p.
54. TEIXEIRA MAGALHAES, Karina; et al. "Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, num. 7, [ref. July 2010], p. 1241-1250. Disponible en web: <<http://www.springerlink.com/content/eu727wl405nq88l2/>>.

55. TERRAZAS CASILDO, Rubén Darío Moreno. *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración del tepache* [en línea]. México: División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, [ref. 2005], 132 p. Disponible en web: <<http://148.206.53.231/UAMI11992.pdf>>.
56. THERON, Maria M.; RYKERS LUES, J. F. *Organic acids and food preservation*. USA: Taylor and Francis Group, 2011. 318 p.
57. *The pineapple: botany, production and uses*. BARTHOLOMEW, Duane Phillip; PAULL, Robert E.; ROHRBACH, Kenneth G. (eds.). United Kingdom: CAB International, 2003. 301 p.
58. TIETZE, Harold W. *Kefir, for pleasure, beauty and well being*. Australia: PHREE Books, 1996. 57 p.
59. _____. *Water medicine*. 2a ed. Australia: PHREE Books, 1997. 99 p.
60. TREYBAL, Robert Ewald. *Operaciones de transferencia de masa*. 2a ed. México: McGraw-Hill, 1980. 858 p.
61. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. *Pineapple, raw, all varieties* [en línea]. <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2441?fg=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=>> [Consulta: 07 de marzo de 2012].

62. Yeast in food and beverages. vol 2. QUEROL, Amparo; FLEET, Graham H. (eds.). En: *The yeast handbook*. Germany: Springer-Verlag, 2006. 453 p.

63. ZUMBADO FERNÁNDEZ, Héctor. *Análisis químico de los alimentos, métodos clásicos*. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 2004. 437 p.

APÉNDICES

1. Muestra de cálculo

- Cálculo de la concentración de la biomasa drenada y de la biomasa seca:

$$m = \frac{m_f - m_t}{V_t} \quad \text{[Ecuación No.1]}$$

Donde:

m = biomasa (g/mL)

m_f = masa final (g)

m_t = tara (g)

V_t = volumen total del medio fermentado (mL)

Ejemplo: determinación de la concentración de la biomasa drenada, del duplicado, al tiempo cero de la tabla XXVI.

$$m = \frac{43,722 - 40,718}{200}$$

$$m = 0,0150 \text{ g/mL}$$

De igual forma se realizaron los cálculos de las concentraciones de la biomasa drenada y de la biomasa seca de las tablas XXVI, XXVII, XXXIII, XXXIV, XL, y XLI.

- Determinación de la densidad del aire:

$$\rho_a = \frac{0,34848 * P - 0,009 * h_r * e^{0,061 * T}}{(273,15 + T) * 1000} \quad [\text{Ecuación No.2}]$$

Donde:

- ρ_a = densidad del aire (g/mL)
- P = presión barométrica (hPa)
- h_r = humedad relativa del aire (%)
- T = temperatura del aire (°C)

Por lo tanto, la determinación de la densidad del aire se realizó de la siguiente forma:

$$\rho_a = \frac{0,34848 * 856,062927 - 0,009 * 76 * e^{0,061 * 19,9}}{(273,15 + 19,9) * 1000}$$

$$\rho_a = 0,0010101 \text{ g/mL}$$

- Determinación de la densidad relativa:

$$\rho_r = \frac{m_m - (m_t - \rho_a * V)}{m_{H_2O} - (m_t - \rho_a * V)} \quad [\text{Ecuación No. 3}]$$

Donde:

- ρ_r = densidad relativa de la muestra
- ρ_a = densidad del aire (g/mL)
- m_m = masa del picnómetro conteniendo la muestra (g)
- m_{H_2O} = masa del picnómetro conteniendo agua destilada (g)

m_t = tara del picnómetro vacío (g)

V = volumen del picnómetro (mL)

Ejemplo: cálculo de la densidad del medio fermentado, del duplicado, al tiempo cero de la tabla XXVIII.

$$\rho = \frac{16,523 - (11,325 - 0,0010101 * 5)}{16,315 - (11,325 - 0,0010101 * 5)}$$

$$\rho = 1,042$$

De igual forma se realizaron los cálculos de la densidad de las tablas XXVIII, XXXV, y XLII.

- Cálculo de las poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y levaduras viables en el medio fermentado:

$$N_{Im} = \log_{10}(N_M) \quad \text{[Ecuación No. 4]}$$

Donde:

N_{Im} = logaritmo de la población de microorganismos

\log_{10} = logaritmo de base 10

N = población de microorganismos (UFC/mL)

Ejemplo: determinación el logaritmo de la población de bacterias ácido-lácticas del medio fermentado, del duplicado, a las 24 horas de fermentación de la tabla XXXI.

$$N_{Im} = \log_{10}(3,50 * 10^{11})$$

$$N_{lm} = 11,544$$

De igual forma se realizaron los cálculos del logaritmo de las poblaciones de microorganismos de las tablas XXXI, XXXII, XXXVIII, XXXIX, XLV, y XLVI.

- Cálculo de la acidez total titulable

A partir de valoración con hidróxido de sodio de la muestra del medio fermentado, se determinó el punto de equivalencia de la titulación por medio del análisis gráfico de la segunda derivada de la curva de titulación a través del programa *Logger Pro Demo 3.8.6* de *Vernier Software & Technology, LLC*.

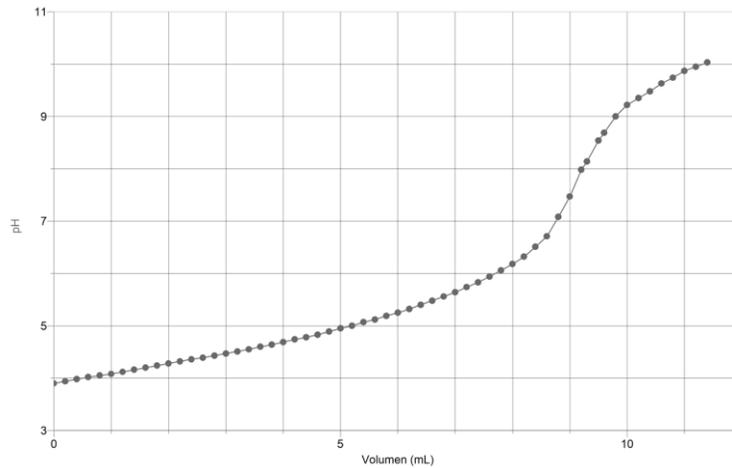
Ejemplo: determinación del puntos de equivalencia, a partir de la segunda derivada de la curva de titulación obtenida, de la muestra en el tiempo cero de la tabla XLIV.

Tabla XXV. **Ejemplo de los datos de la primera y segunda derivada de la curva de titulación del medio fermentado (tiempo cero de la tabla XLIV)**

Volumen (mL)	pH	$\frac{dpH}{dV}$	$\frac{d^2pH}{d^2V}$	Volumen (mL)	pH	$\frac{dpH}{dV}$	$\frac{d^2pH}{d^2V}$
0,00	3,90	0,20	-0,02	6,00	5,25	0,34	0,11
0,20	3,94	0,20	-0,03	6,20	5,32	0,37	0,12
0,40	3,98	0,19	-0,05	6,40	5,40	0,39	0,09
0,60	4,02	0,18	-0,05	6,60	5,48	0,40	0,08
0,80	4,05	0,16	0,00	6,80	5,56	0,41	0,11
1,00	4,08	0,18	0,05	7,00	5,64	0,45	0,15
1,20	4,12	0,19	0,05	7,20	5,74	0,48	0,17
1,40	4,16	0,20	0,02	7,40	5,83	0,51	0,22
1,60	4,20	0,20	0,01	7,60	5,94	0,57	0,27
1,80	4,24	0,20	-0,01	7,80	6,06	0,61	0,37
2,00	4,28	0,20	-0,02	8,00	6,18	0,68	0,62
2,20	4,32	0,19	-0,03	8,20	6,32	0,84	0,99
2,40	4,36	0,18	-0,02	8,40	6,51	1,06	1,44
2,60	4,39	0,18	0,02	8,60	6,71	1,44	1,71
2,80	4,43	0,19	0,04	8,80	7,08	1,84	1,46
3,00	4,47	0,20	0,04	9,00	7,47	2,11	0,72
3,20	4,51	0,21	0,04	9,20	7,98	2,14	-0,32
3,40	4,55	0,22	0,04	9,30	8,14	1,93	-1,05
3,60	4,60	0,23	0,03	9,50	8,54	1,78	-1,39
3,80	4,64	0,23	0,03	9,60	8,69	1,51	-1,58
4,00	4,69	0,24	0,02	9,80	9,00	1,25	-1,41
4,20	4,74	0,23	0,02	10,00	9,22	0,93	-1,16
4,40	4,78	0,24	0,07	10,20	9,35	0,73	-0,69
4,60	4,83	0,27	0,09	10,40	9,48	0,69	-0,36
4,80	4,89	0,29	0,05	10,60	9,63	0,64	-0,28
5,00	4,95	0,28	0,03	10,80	9,74	0,59	-0,30
5,20	5,00	0,30	0,03	11,00	9,87	0,52	-0,32
5,40	5,07	0,30	0,03	11,20	9,95	0,44	-0,28
5,60	5,12	0,31	0,06	11,40	10,03	0,41	-0,21
5,80	5,19	0,32	0,08				

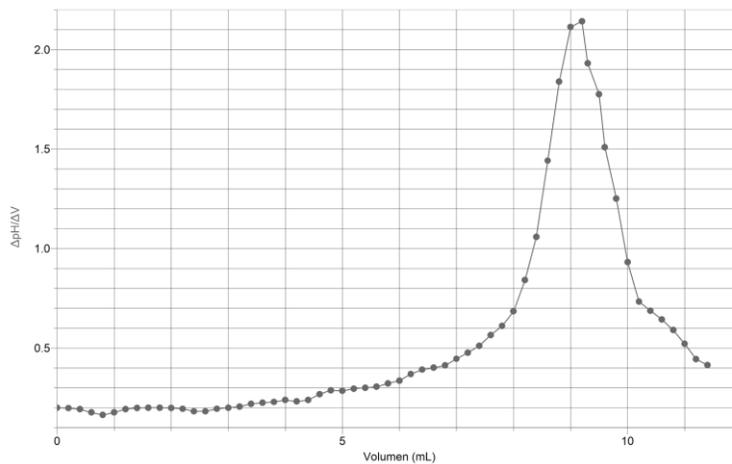
Fuente: elaboración propia.

Figura 32. **Ejemplo de la curva de titulación del medio fermentado (tiempo cero de la tabla XLIV)**



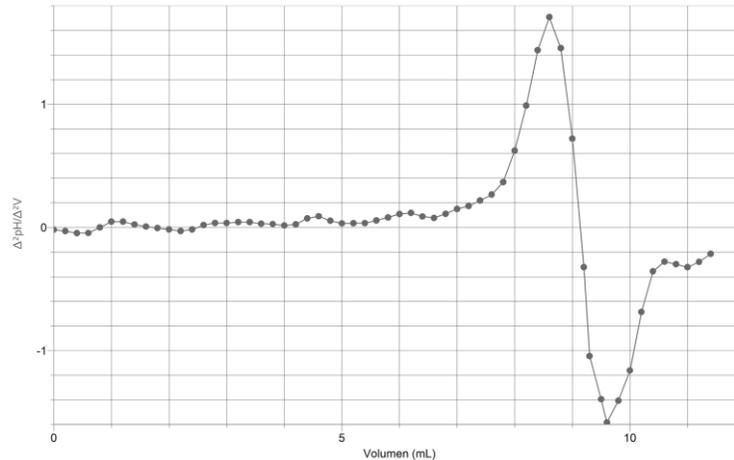
Fuente: elaboración propia.

Figura 33. **Ejemplo de la primera derivada de la curva de titulación del medio fermentado (tiempo cero de la tabla XLIV)**



Fuente: elaboración propia.

Figura 34. **Ejemplo de la segunda derivada de la curva de titulación del medio fermentado (tiempo cero de la tabla XLIV)**



Fuente: elaboración propia.

A partir del punto de equivalencia obtenido la segunda derivada de la curva de titulación de la muestra se procedió al cálculo de la acidez total titulable expresada como miligramos de ácido láctico por mililitro.

$$AT_{al} = \frac{V_{OH} * C_{OH}}{V} * M_{AL} \quad \text{[Ecuación No. 5]}$$

Donde:

AT_{al} = acidez total titulable equivalente a ácido láctico (mg/mL)

V_{OH} = volumen desplazado del titulante (mL)

C_{OH} = concentración del titulante (mol/L)

M_{al} = masa molar del ácido láctico (g/mol)

V = volumen de la muestra titulada (mL)

Ejemplo: cálculo de la acidez total titulable a partir del punto de equivalencia de la segunda derivada de la curva de titulación, de la muestra en el tiempo cero de la tabla XLIV.

$$AT_{al1} = \frac{9,135 * 0,05028}{10} * 90,08$$

$$AT_{al1} = 4,137 \text{ mg/mL}$$

De igual forma se realizaron los cálculos de la acidez total titulable de las tablas XXX, XXXVII, y XLIV.

- Cálculo del valor promedio

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad [\text{Ecuación No. 6}]$$

Donde:

- \bar{x} = valor promedio
- x_i = valor del dato i
- n = número total de datos

Ejemplo: cálculo del valor promedio de la concentración de la biomasa drenada al tiempo cero de la tabla XXVI.

$$\bar{x} = \frac{0,01501 + 0,01502}{2}$$

$$\bar{x} = 0,0150 \text{ g/mL}$$

De igual forma se realizaron los cálculos del valor promedio de las tablas XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI, XXXVIII, XXXIX, XL, XLI, XLII, XLIII, XLV, y XLVI.

2. Datos calculados

Tabla XXVI. **Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa drenada (g)	Biomasa drenada (g/mL)	Biomasa drenada media (g/mL)
0	3,001	0,000	3,001	0,01501	0,0150
	3,004	0,000	3,004	0,01502	
12	36,991	33,213	3,778	0,01889	0,0193
	39,766	35,819	3,947	0,01974	
24	33,377	28,717	4,660	0,02330	0,0248
	49,409	44,160	5,249	0,02625	
36	47,987	41,157	6,830	0,03415	0,0350
	47,892	40,718	7,174	0,03587	
48	41,742	33,213	8,529	0,04265	0,0400
	43,297	35,819	7,478	0,03739	
60	51,536	44,160	7,376	0,03688	0,0403
	37,473	28,717	8,756	0,04378	
72	49,036	41,157	7,879	0,03940	0,0413
	49,809	40,718	8,652	0,04326	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVII. **Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa seca (g)	Biomasa seca (g/mL)	Biomasa seca media (g/mL)
0	41,624	41,158	0,466	0,00233	0,0022
	41,147	40,718	0,429	0,00214	
12	33,828	33,213	0,615	0,00308	0,0031
	36,435	35,819	0,616	0,00308	
24	29,464	28,717	0,747	0,00374	0,0040
	44,996	44,163	0,833	0,00417	
36	42,184	41,157	1,027	0,00514	0,0051
	41,714	40,718	0,996	0,00498	
48	34,356	33,213	1,143	0,00572	0,0055
	36,884	35,819	1,065	0,00532	
60	45,211	44,160	1,051	0,00526	0,0056
	29,889	28,717	1,172	0,00586	
72	42,236	41,158	1,078	0,00539	0,0055
	41,857	40,718	1,139	0,00569	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXVIII. **Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa total de muestra (g)	Masa total de agua (g)	Masa del picnómetro (g)	Densidad relativa	Densidad relativa media
0	16,527	16,315	11,325	1,0425	1,042
	16,523	16,315	11,325	1,0417	
12	16,517	16,315	11,325	1,0405	1,040
	16,513	16,315	11,325	1,0397	
24	16,457	16,315	11,325	1,0285	1,028
	16,454	16,315	11,325	1,0279	
36	16,386	16,315	11,325	1,0142	1,015
	16,392	16,315	11,325	1,0154	
48	16,339	16,315	11,325	1,0048	1,005
	16,339	16,315	11,325	1,0048	
60	16,323	16,315	11,325	1,0016	1,001
	16,321	16,315	11,325	1,0012	
72	16,317	16,315	11,325	1,0004	1,000
	16,317	16,315	11,325	1,0004	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXIX. **Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Acidez activa (pH)	Acidez activa media (pH)
0	3,74	3,75
	3,75	
12	3,68	3,68
	3,68	
24	4,06	4,07
	4,07	
36	3,78	3,79
	3,79	
48	3,67	3,67
	3,67	
60	3,58	3,58
	3,58	
72	3,51	3,51
	3,51	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXX. **Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Volumen NaOH (mL)	$\frac{1}{2}$ pH _{eq}	Acidez total titulada (mmol/mL)	Ácido láctico (mg/mL)
0	7,588	3,904	0,03725	3,355
12	8,125	4,007	0,03988	3,593
24	6,136	3,789	0,03012	2,713
36	8,975	4,149	0,04406	3,969
48	12,625	4,010	0,06197	5,582
60	13,943	3,976	0,06844	6,165
72	18,270	4,088	0,08968	8,079

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXI. **Población total de bacterias ácido-lácticas viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	4,00E10	10,602	11,073
	3,50E11	11,544	
48	2,00E06	6,301	6,349
	2,50E06	6,398	
72	4,00E07	7,602	7,301
	1,00E07	7,000	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXII. **Población total de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,015 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	3.00E07	7,477	8,477
	3.00E09	9,477	
48	1.00E06	6,000	6,151
	2.00E06	6,301	
72	3.60E04	4,556	4,579
	4.00E04	4,602	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIII. **Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa drenada (g)	Biomasa drenada (g/mL)	Biomasa drenada media (g/mL)
0	6,004	0,000	6,004	0,03002	0,0300
	6,001	0,000	6,001	0,03001	
12	51,988	44,160	7,828	0,03914	0,0393
	36,612	28,717	7,895	0,03948	
24	42,727	33,213	9,514	0,04757	0,0495
	46,099	35,820	10,279	0,05140	
36	51,410	41,157	10,253	0,05127	0,0489
	50,034	40,718	9,316	0,04658	
48	54,767	44,160	10,607	0,05304	0,0524
	39,056	28,717	10,339	0,05170	
60	43,438	33,213	10,225	0,05113	0,0506
	45,819	35,819	10,000	0,05000	
72	50,850	40,718	10,132	0,05066	0,0488
	50,096	41,157	9,378	0,04689	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIV. **Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa seca (g)	Biomasa seca (g/mL)	Biomasa seca media (g/mL)
0	42,052	41,157	0,895	0,00448	0,0044
	41,580	40,718	0,862	0,00431	
12	45,303	44,160	1,143	0,00572	0,0057
	29,845	28,717	1,128	0,00564	
24	34,542	33,213	1,329	0,00665	0,0070
	37,273	35,820	1,453	0,00727	
36	42,549	41,157	1,392	0,00696	0,0067
	42,013	40,718	1,295	0,00647	
48	45,584	44,160	1,424	0,00712	0,0070
	30,074	28,717	1,357	0,00679	
60	34,585	33,213	1,372	0,00686	0,0068
	37,172	35,819	1,353	0,00676	
72	42,546	41,157	1,389	0,00695	0,0066
	41,977	40,718	1,259	0,00629	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXV. **Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa total de muestra (g)	Masa total de agua (g)	Masa del picnómetro (g)	Densidad relativa	Densidad relativa media
0	16,518	16,315	11,325	1,0407	1,041
	16,518	16,315	11,325	1,0407	
12	16,491	16,315	11,325	1,0353	1,035
	16,492	16,315	11,325	1,0355	
24	16,413	16,315	11,325	1,0196	1,019
	16,410	16,315	11,325	1,0190	
36	16,353	16,315	11,325	1,0076	1,008
	16,354	16,315	11,325	1,0078	
48	16,329	16,315	11,325	1,0028	1,003
	16,328	16,315	11,325	1,0026	
60	16,323	16,315	11,325	1,0016	1,002
	16,323	16,315	11,325	1,0016	
72	16,325	16,315	11,325	1,0020	1,002
	16,323	16,315	11,325	1,0016	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVI. **Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Acidez activa (pH)	Acidez activa media (pH)
0	3,74	3,75
	3,75	
12	3,75	3,75
	3,75	
24	3,59	3,60
	3,60	
36	3,57	3,58
	3,58	
48	3,55	3,55
	3,55	
60	3,53	3,53
	3,52	
72	3,50	3,48
	3,46	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVII. **Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Volumen NaOH (mL)	$\frac{1}{2}$ pH _{eq}	Acidez total titulada (mmol/mL)	Ácido láctico (mg/mL)
0	9,920	4,007	0,04988	4,493
12	10,010	4,023	0,05033	4,534
24	12,140	4,061	0,06104	5,498
36	15,550	4,067	0,07819	7,043
48	17,100	4,050	0,08598	7,745
60	20,130	4,080	0,10121	9,117
72	22,880	4,052	0,11504	10,363

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXVIII. **Población total de bacterias ácido-lácticas viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (Inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	6,00E08	8,778	8,889
	1,00E09	9,000	
48	8,00E08	8,903	9,253
	4,00E09	9,602	
72	8,20E08	8,914	8,919
	8,40E08	8,924	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XXXIX. **Población total de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,030 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	5,00E09	9,699	9,628
	3,60E09	9,556	
48	5,00E08	8,699	8,151
	4,00E07	7,602	
72	3,00E08	8,477	8,239
	1,00E08	8,000	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XL. **Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa drenada (g)	Biomasa drenada (g/mL)	Biomasa drenada media (g/mL)
0	12,013	0,000	12,013	0,06007	0,0600
	12,006	0,000	12,006	0,06003	
12	57,860	40,721	17,139	0,08570	0,0851
	58,055	41,157	16,898	0,08449	
24	65,037	44,166	20,871	0,10436	0,1011
	48,300	28,717	19,583	0,09792	
36	54,756	33,212	21,544	0,10772	0,1075
	57,271	35,819	21,452	0,10726	
48	62,032	40,720	21,312	0,10656	0,1045
	61,651	41,158	20,493	0,10247	
60	65,978	44,163	21,815	0,10908	0,1113
	51,412	28,717	22,695	0,11348	
72	54,509	33,213	21,296	0,10648	0,1060
	56,934	35,819	21,115	0,10558	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLI. **Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa (g)	Tara (g)	Biomasa seca (g)	Biomasa seca (g/mL)	Biomasa seca media (g/mL)
0	37,680	35,819	1,861	0,00930	0,0092
	35,035	33,212	1,823	0,00911	
12	43,271	40,721	2,550	0,01275	0,0127
	43,690	41,157	2,533	0,01267	
24	47,170	44,166	3,004	0,01502	0,0148
	31,622	28,717	2,905	0,01453	
36	36,262	33,212	3,050	0,01525	0,0154
	38,925	35,819	3,106	0,01553	
48	43,727	40,720	3,007	0,01504	0,0147
	44,036	41,158	2,878	0,01439	
60	47,119	44,163	2,956	0,01478	0,0151
	31,809	28,717	3,092	0,01546	
72	36,105	33,213	2,892	0,01446	0,0143
	38,644	35,819	2,825	0,01413	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLII. **Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Masa total de muestra (g)	Masa total de agua (g)	Masa del picnómetro (g)	Densidad relativa	Densidad relativa media
0	16,503	16,315	11,325	1,0377	1,038
	16,505	16,315	11,325	1,0381	
12	16,448	16,315	11,325	1,0267	1,026
	16,440	16,315	11,325	1,0251	
24	16,352	16,315	11,325	1,0074	1,007
	16,351	16,315	11,325	1,0072	
36	16,333	16,315	11,325	1,0036	1,003
	16,330	16,315	11,325	1,0030	
48	16,332	16,315	11,325	1,0034	1,003
	16,325	16,315	11,325	1,0020	
60	16,327	16,315	11,325	1,0024	1,002
	16,327	16,315	11,325	1,0024	
72	16,325	16,315	11,325	1,0020	1,002
	16,326	16,315	11,325	1,0022	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLIII. **Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Acidez activa (pH)	Acidez activa media (pH)
0	3,90	3,90
	3,89	
12	4,06	4,06
	4,06	
24	3,77	3,77
	3,76	
36	3,62	3,63
	3,63	
48	3,56	3,56
	3,56	
60	3,52	3,52
	3,52	
72	3,49	3,50
	3,50	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLIV. **Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Volumen NaOH (mL)	½ pHeq	Acidez total titulada (mmol/mL)	Ácido láctico (mg/mL)
0	9,135	3,908	0,04593	4,137
12	6,881	3,933	0,03460	3,117
24	11,959	3,886	0,06013	5,416
36	15,218	3,996	0,07652	6,893
48	17,550	4,041	0,08824	7,949
60	18,575	3,946	0,09340	8,413
72	22,925	4,066	0,11527	10,383

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLV. **Población total de bacterias ácido-lácticas viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	1,00E07	7,000	6,588
	1,50E06	6,176	
48	2,00E06	6,301	6,540
	6,00E06	6,778	
72	6,60E07	7,820	7,780
	5,50E07	7,740	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLVI. **Población total de levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación (inóculo de 0,060 g/mL)**

Tiempo (h)	Población total (UFC/mL)	Log ₁₀ (UFC/mL)	Log ₁₀ medio (UFC/mL)
0	0	0,000	0,000
	0	0,000	
24	8,00E06	6,903	6,355
	6,40E05	5,806	
48	4,00E05	5,602	5,671
	5,50E05	5,740	
72	8,00E05	5,903	6,540
	1,50E07	7,176	

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLVII. **Concentración de la biomasa drenada fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Biomasa drenada (g/mL)						
	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
0,015	0,0150	0,0193	0,0248	0,0350	0,0400	0,0403	0,0413
0,030	0,0300	0,0393	0,0495	0,0489	0,0524	0,0506	0,0488
0,060	0,0600	0,0851	0,1011	0,1075	0,1045	0,1113	0,1060

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLVIII. **Concentración de la biomasa seca fermentada a 30 °C, en función del tiempo de fermentación con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Biomasa drenada (g/mL)						
	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
0,015	0,0022	0,0031	0,0040	0,0051	0,0055	0,0056	0,0055
0,030	0,0044	0,0057	0,0070	0,0067	0,0070	0,0068	0,0066
0,060	0,0092	0,0127	0,0148	0,0154	0,0147	0,0151	0,0143

Fuente: elaboración propia.

Tabla XLIX. **Densidad relativa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Densidad relativa						
	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
0,015	1,042	1,040	1,028	1,015	1,005	1,001	1,000
0,030	1,041	1,035	1,019	1,008	1,003	1,002	1,002
0,060	1,038	1,026	1,007	1,003	1,003	1,002	1,002

Fuente: elaboración propia.

Tabla L. **Acidez activa del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Acidez activa (pH)						
	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
0,015	3,75	3,68	4,07	3,79	3,67	3,58	3,51
0,030	3,75	3,75	3,60	3,58	3,55	3,53	3,45
0,060	3,90	4,06	3,77	3,63	3,56	3,52	3,48

Fuente: elaboración propia.

Tabla LI. **Acidez total titulable del medio fermentado a 30 °C, en función del tiempo de fermentación y con base en la proporción de inóculo**

Inóculo (g/mL)	Ácido láctico (mg/mL)						
	Tiempo (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
0,015	3,355	3,593	2,713	3,969	5,582	6,165	8,079
0,030	4,493	4,534	5,498	7,043	7,745	9,117	10,363
0,060	4,137	3,117	5,416	6,893	7,949	8,413	10,383

Fuente: elaboración propia.

Tabla LII. **Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,015 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Microorganismos	Log ₁₀ (UFC/mL)			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Bacterias ácido-lácticas	0,000	11,073	6,349	7,301
Levaduras	0,000	8,477	6,151	4,579

Fuente: elaboración propia.

Tabla LIII. **Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,030 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Microorganismos	Log ₁₀ (UFC/mL)			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Bacterias ácido-lácticas	0,000	8,889	9,253	8,919
Levaduras	0,000	9,628	8,151	8,239

Fuente: elaboración propia.

Tabla LIV. **Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y levaduras viables en el medio fermentado a 30 °C, inoculado en proporción de 0,060 g/mL, en función del tiempo de fermentación**

Microorganismos	Log ₁₀ (UFC/mL)			
	Tiempo (h)			
	0	24	48	72
Bacterias ácido-lácticas	0,000	6,588	6,540	7,780
Levaduras	0,000	6,355	5,671	6,540

Fuente: elaboración propia.

3. Análisis estadístico

Tabla LV. **Análisis de varianza de la concentración de la biomasa drenada**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	0,03324	2	0,01662	2950,633	1,87E-26	3,47
Tiempo	0,00518	6	0,00086	153,348	3,15E-16	2,57
Interacción	0,00099	12	0,00008	14,623	1,38E-07	2,25
Error	0,00012	21	0,00001	-----	-----	-----
Total	0,03953	41	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

Tabla LVI. **Análisis de varianza de la concentración de la biomasa seca**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	0,00068	2	0,00034	4193,198	4,72E-28	3,47
Tiempo	0,00008	6	0,00001	154,291	2,96E-16	2,57
Interacción	0,00001	12	0,00000	15,096	1,04E-07	2,25
Error	0,00000	21	0,00000	-----	-----	-----
Total	0,00077	41	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

Tabla LVII. **Análisis de varianza de la densidad relativa del medio fermentado**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	0,00036	2	0,00018	839,560	9,19E-21	3,47
Tiempo	0,00919	6	0,00153	7116,142	1,31E-33	2,57
Interacción	0,00045	12	0,00004	174,544	3,21E-18	2,25
Error	0,00000	21	0,00000	-----	-----	-----
Total	0,01000	41	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

Tabla LVIII. **Análisis de varianza de la acidez activa del medio fermentado**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	0,11263	2	0,05632	657,028	1,16E-19	3,47
Tiempo	0,68298	6	0,11383	1328,019	5,78E-26	2,57
Interacción	0,37903	12	0,03159	368,505	1,36E-21	2,25
Error	0,00180	21	0,00009	-----	-----	-----
Total	1,17645	41	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

Tabla LIX. **Análisis de varianza de la acidez total titulable del medio fermentado**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	19,36154	2	9,68077	22,81299	8,15E-05	3,89
Tiempo	86,78804	6	14,46467	34,08639	7,36E-07	3,00
Error	5,09224	12	0,42435	-----	-----	-----
Total	111,24181	20	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

Tabla LX. **Análisis de varianza de la población total de bacterias ácido-lácticas viables en el medio fermentado**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	9,64744	2	4,82372	42,72130	3,49E-06	3,89
Tiempo	300,09308	3	100,03103	885,92536	2,41E-14	3,49
Interacción	23,78534	6	3,96422	35,10917	6,24E-07	3,00
Error	1,35494	12	0,11291	-----	-----	-----
Total	334,88080	23	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

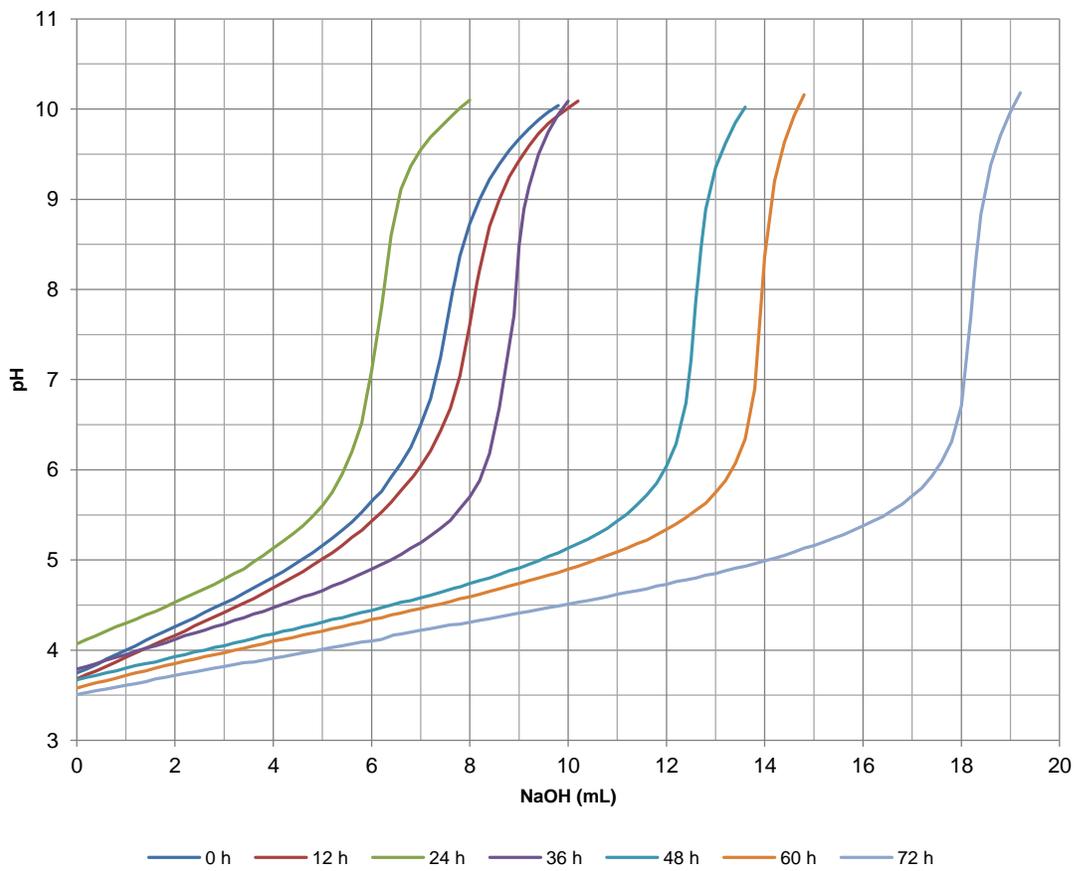
Tabla LXI. **Análisis de varianza de la población total de levaduras del medio fermentado**

	SC	GL	CM	F	P	F crítico
Inóculo	17,05125	2	8,52563	24,39729	5,91E-05	3,89
Tiempo	236,40038	3	78,80013	225,49772	8,16E-11	3,49
Interacción	14,30782	6	2,38464	6,82397	2,47E-03	3,00
Error	4,19340	12	0,34945	-----	-----	-----
Total	271,95285	23	-----	-----	-----	-----

Fuente: elaboración propia.

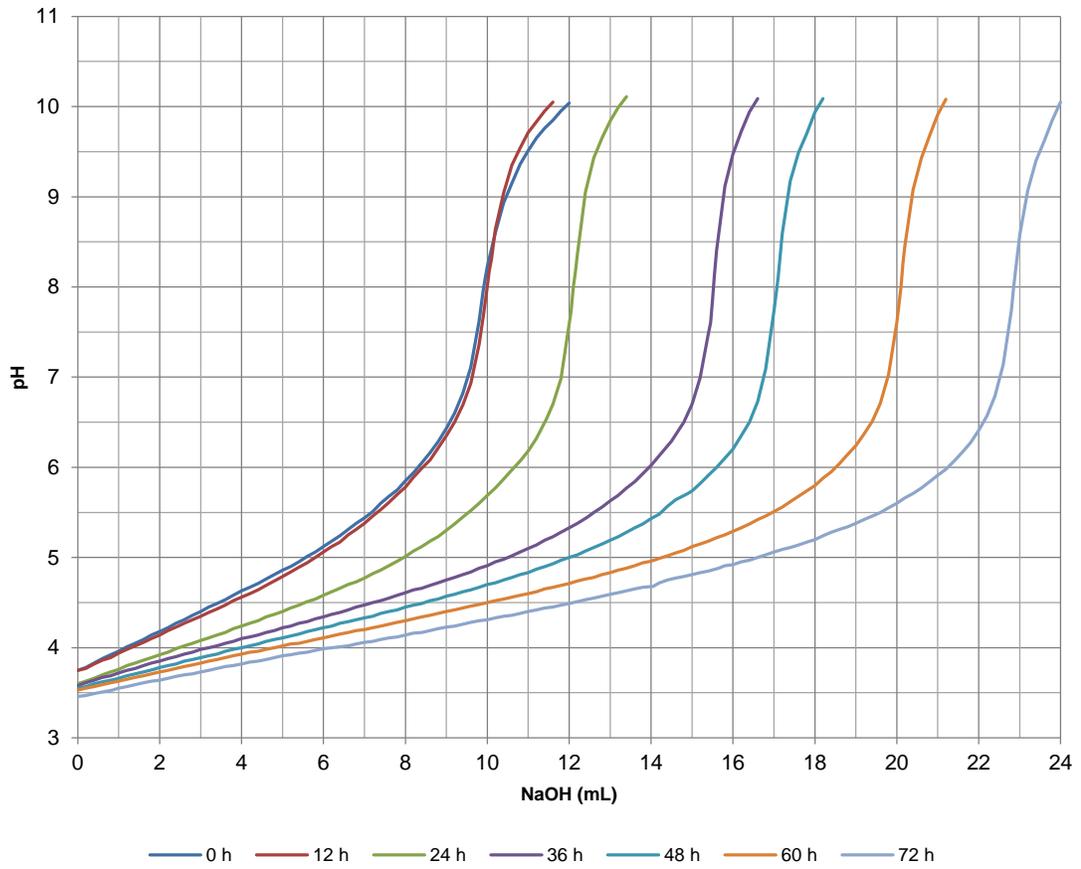
4. Curvas de titulación

Figura 35. **Curvas de titulación del medio fermentado a 30 °C, inoculado con granos de tибicos en proporción de 0,015 g/mL**



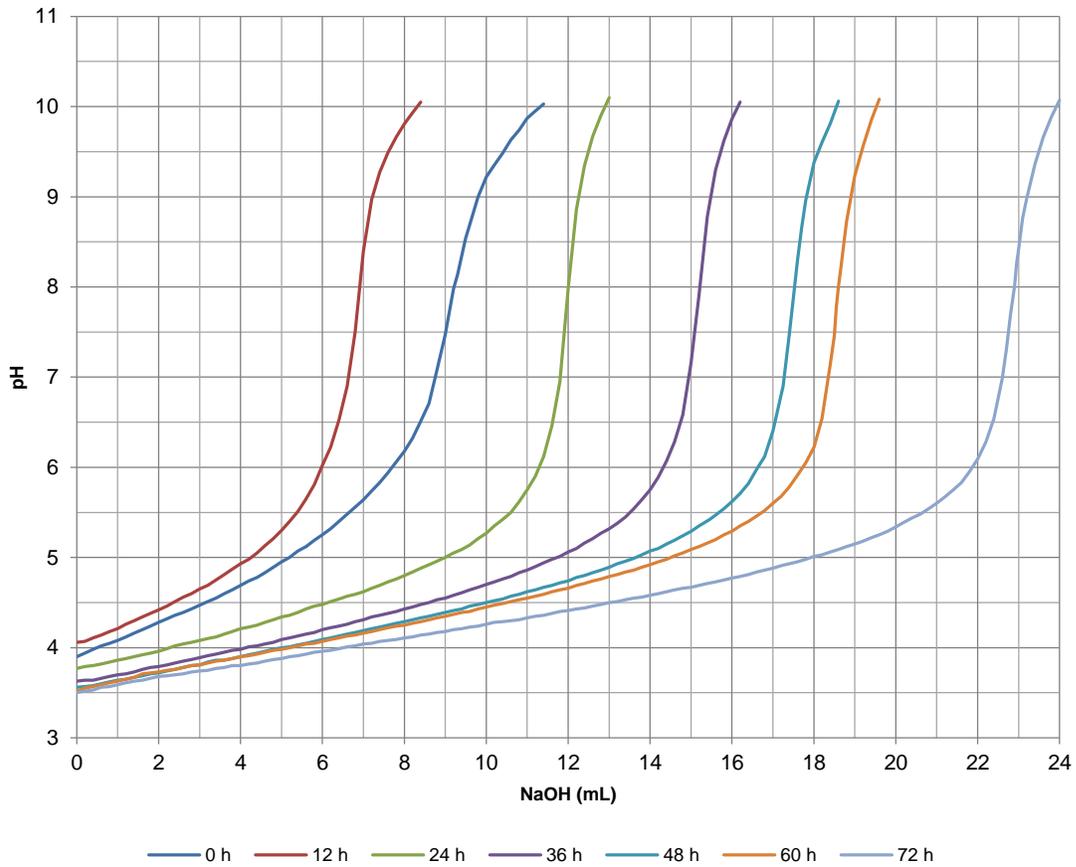
Fuente: elaboración propia.

Figura 36. **Curvas de titulación del medio fermentado a 30 °C, inoculado con granos de tибicos en proporción de 0,030 g/mL**



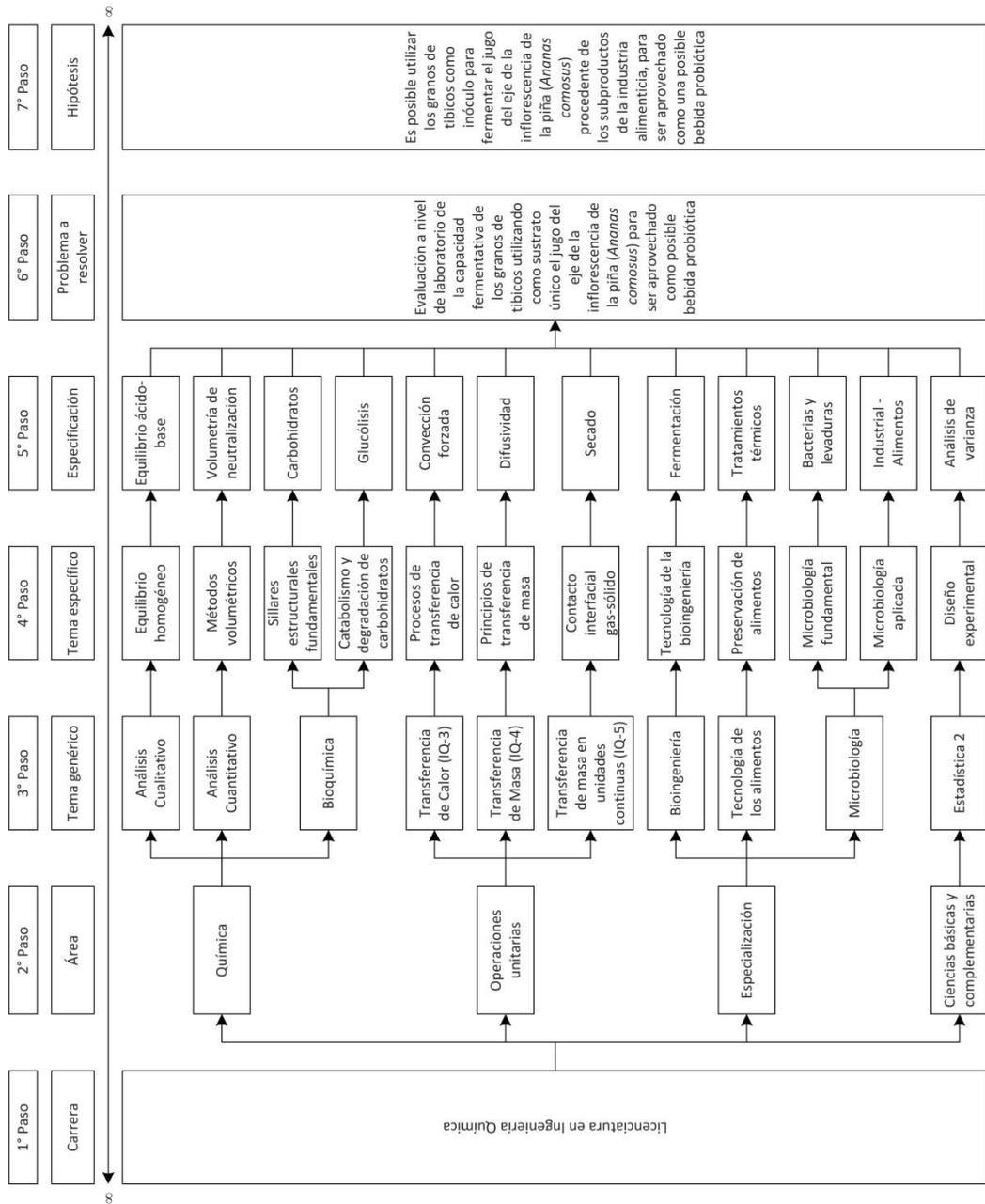
Fuente: elaboración propia.

Figura 37. **Curvas de titulación del medio fermentado a 30 °C, inoculado con granos de tибicos en proporción de 0,060 g/mL**



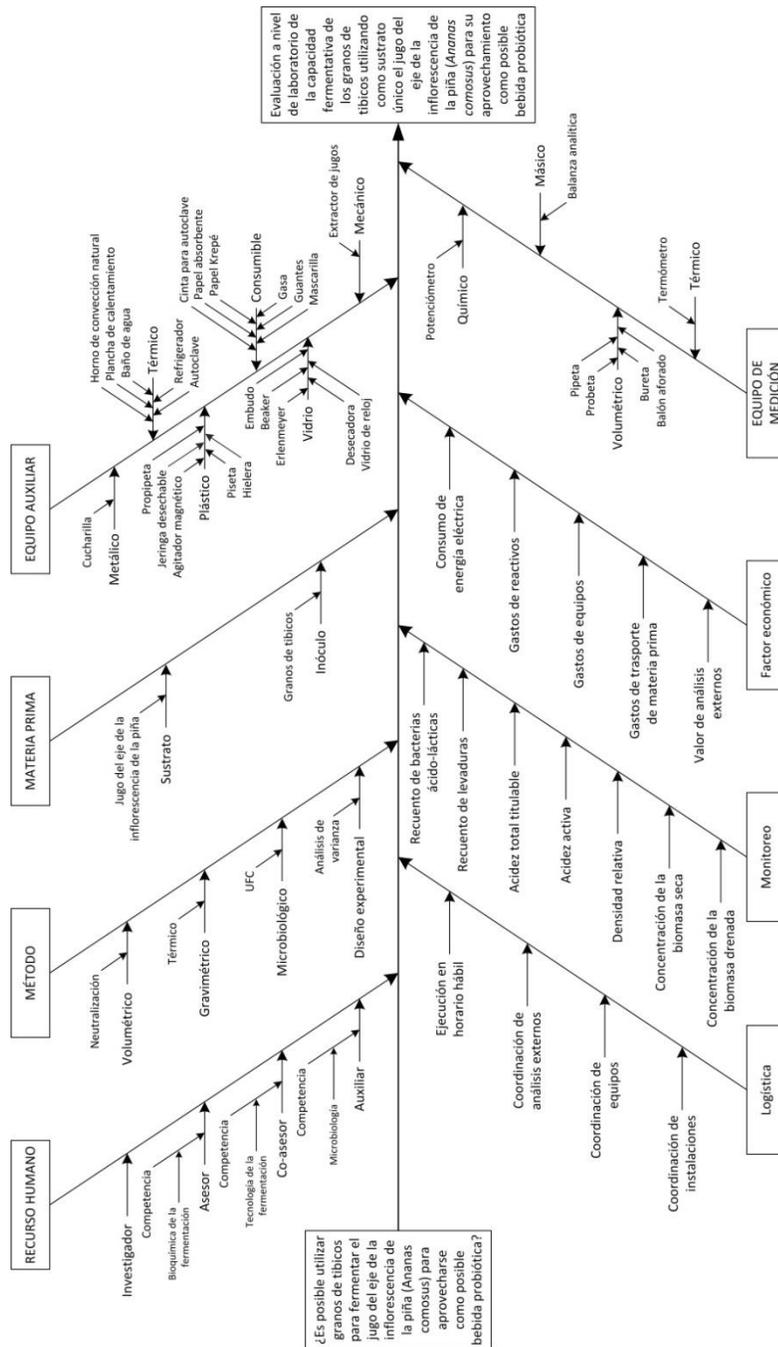
Fuente: elaboración propia.

5. Diagrama de requisitos académicos



Fuente: elaboración propia.

6. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

1. Puntos porcentuales superiores para la distribución F

ν_2	α	ν_1								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.100	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86
	0.050	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
	0.010	4052.18	4999.50	5403.35	5624.58	5763.65	5858.99	5928.36	5981.07	6022.47
	0.001	405284	500012	540382	562501	576405	585938	592874	598144	603040
2	0.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38
	0.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
	0.010	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39
	0.001	998.50	999.00	999.17	999.25	999.30	999.33	999.36	999.37	999.39
3	0.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24
	0.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
	0.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35
	0.001	167.03	148.50	141.11	137.10	134.58	132.85	131.58	130.62	129.86
4	0.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94
	0.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
	0.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66
	0.001	74.14	61.25	56.18	53.44	51.71	50.53	49.66	49.00	48.47
5	0.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32
	0.050	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
	0.010	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16
	0.001	47.18	37.12	33.20	31.09	29.75	28.83	28.16	27.65	27.24
6	0.100	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96
	0.050	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
	0.010	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98
	0.001	35.51	27.00	23.70	21.92	20.80	20.03	19.46	19.03	18.69
7	0.100	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72
	0.050	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
	0.010	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72
	0.001	29.25	21.69	18.77	17.20	16.21	15.52	15.02	14.63	14.33
8	0.100	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56
	0.050	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
	0.010	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91
	0.001	25.41	18.49	15.83	14.39	13.48	12.86	12.40	12.05	11.77
9	0.100	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44
	0.050	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
	0.010	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35
	0.001	22.86	16.39	13.90	12.56	11.71	11.13	10.70	10.37	10.11

Continuación del anexo 1

ν_2	α	ν_1								
		10	12	15	20	25	30	40	50	60
1	0.100	60.19	60.71	61.22	61.74	62.05	62.26	62.53	62.69	62.79
	0.050	241.88	243.91	245.95	248.01	249.26	250.10	251.14	251.77	252.20
	0.010	6055.85	6106.32	6157.29	6208.73	6239.83	6260.65	6286.78	6302.52	6313.03
	0.001	606316	611276	616292	621362	624430	626486	659725	660511	6610390
2	0.100	9.39	9.41	9.42	9.44	9.45	9.46	9.47	9.47	9.47
	0.050	19.40	19.41	19.43	19.45	19.46	19.46	19.47	19.48	19.48
	0.010	99.40	99.42	99.43	99.45	99.46	99.47	99.47	99.48	99.48
	0.001	999.40	999.42	999.43	999.45	999.46	999.47	999.47	999.48	999.48
3	0.100	5.23	5.22	5.20	5.18	5.17	5.17	5.16	5.15	5.15
	0.050	8.79	8.74	8.70	8.66	8.63	8.62	8.59	8.58	8.57
	0.010	27.23	27.05	26.87	26.69	26.58	26.50	26.41	26.35	26.32
	0.001	129.25	128.32	127.37	126.42	125.84	125.45	124.96	124.66	124.47
4	0.100	3.92	3.90	3.87	3.84	3.83	3.82	3.80	3.80	3.79
	0.050	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.70	5.69
	0.010	14.55	14.37	14.20	14.02	13.91	13.84	13.75	13.69	13.65
	0.001	48.05	47.41	46.76	46.10	45.70	45.43	45.09	44.88	44.75
5	0.100	3.30	3.27	3.24	3.21	3.19	3.17	3.16	3.15	3.14
	0.050	4.74	4.68	4.62	4.56	4.52	4.50	4.46	4.44	4.43
	0.010	10.05	9.89	9.72	9.55	9.45	9.38	9.29	9.24	9.20
	0.001	26.92	26.42	25.91	25.39	25.08	24.87	24.60	24.44	24.33
6	0.100	2.94	2.90	2.87	2.84	2.81	2.80	2.78	2.77	2.76
	0.050	4.06	4.00	3.94	3.87	3.83	3.81	3.77	3.75	3.74
	0.010	7.87	7.72	7.56	7.40	7.30	7.23	7.14	7.09	7.06
	0.001	18.41	17.99	17.56	17.12	16.85	16.67	16.44	16.31	16.21
7	0.100	2.70	2.67	2.63	2.59	2.57	2.56	2.54	2.52	2.51
	0.050	3.64	3.57	3.51	3.44	3.40	3.38	3.34	3.32	3.30
	0.010	6.62	6.47	6.31	6.16	6.06	5.99	5.91	5.86	5.82
	0.001	14.08	13.71	13.32	12.93	12.69	12.53	12.33	12.20	12.12
8	0.100	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.38	2.36	2.35	2.34
	0.050	3.35	3.28	3.22	3.15	3.11	3.08	3.04	3.02	3.01
	0.010	5.81	5.67	5.52	5.36	5.26	5.20	5.12	5.07	5.03
	0.001	11.54	11.19	10.84	10.48	10.26	10.11	9.92	9.80	9.73
9	0.100	2.42	2.38	2.34	2.30	2.27	2.25	2.23	2.22	2.21
	0.050	3.14	3.07	3.01	2.94	2.89	2.86	2.83	2.80	2.79
	0.010	5.26	5.11	4.96	4.81	4.71	4.65	4.57	4.52	4.48
	0.001	9.89	9.57	9.24	8.90	8.69	8.55	8.37	8.26	8.19

Continuación del anexo 1

ν_2	α	ν_1								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	0.100	3.29	2.92	2.73	2.61	2.52	2.46	2.41	2.38	2.35
	0.050	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
	0.010	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94
	0.001	21.04	14.91	12.55	11.28	10.48	9.93	9.52	9.20	8.96
11	0.100	3.23	2.86	2.66	2.54	2.45	2.39	2.34	2.30	2.27
	0.050	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
	0.010	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63
	0.001	19.69	13.81	11.56	10.35	9.58	9.05	8.66	8.35	8.12
12	0.100	3.18	2.81	2.61	2.48	2.39	2.33	2.28	2.24	2.21
	0.050	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
	0.010	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39
	0.001	18.64	12.97	10.80	9.63	8.89	8.38	8.00	7.71	7.48
13	0.100	3.14	2.76	2.56	2.43	2.35	2.28	2.23	2.20	2.16
	0.050	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
	0.010	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19
	0.001	17.82	12.31	10.21	9.07	8.35	7.86	7.49	7.21	6.98
14	0.100	3.10	2.73	2.52	2.39	2.31	2.24	2.19	2.15	2.12
	0.050	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
	0.010	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03
	0.001	17.14	11.78	9.73	8.62	7.92	7.44	7.08	6.80	6.58
15	0.100	3.07	2.70	2.49	2.36	2.27	2.21	2.16	2.12	2.09
	0.050	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
	0.010	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89
	0.001	16.59	11.34	9.34	8.25	7.57	7.09	6.74	6.47	6.26
16	0.100	3.05	2.67	2.46	2.33	2.24	2.18	2.13	2.09	2.06
	0.050	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
	0.010	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78
	0.001	16.12	10.97	9.01	7.94	7.27	6.80	6.46	6.19	5.98
17	0.100	3.03	2.64	2.44	2.31	2.22	2.15	2.10	2.06	2.03
	0.050	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
	0.010	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68
	0.001	15.72	10.66	8.73	7.68	7.02	6.56	6.22	5.96	5.75
18	0.100	3.01	2.62	2.42	2.29	2.20	2.13	2.08	2.04	2.00
	0.050	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
	0.010	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60
	0.001	15.38	10.39	8.49	7.46	6.81	6.35	6.02	5.76	5.56
19	0.100	2.99	2.61	2.40	2.27	2.18	2.11	2.06	2.02	1.98
	0.050	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
	0.010	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52
	0.001	15.08	10.16	8.28	7.27	6.62	6.18	5.85	5.59	5.39
20	0.100	2.97	2.59	2.38	2.25	2.16	2.09	2.04	2.00	1.96
	0.050	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
	0.010	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46
	0.001	14.82	9.95	8.10	7.10	6.46	6.02	5.69	5.44	5.24

Continuación del anexo 1

ν_2	α	ν_1								
		10	12	15	20	25	30	40	50	60
10	0.100	2.32	2.28	2.24	2.20	2.17	2.16	2.13	2.12	2.11
	0.050	2.98	2.91	2.85	2.77	2.73	2.70	2.66	2.64	2.62
	0.010	4.85	4.71	4.56	4.41	4.31	4.25	4.17	4.12	4.08
	0.001	8.75	8.45	8.13	7.80	7.60	7.47	7.30	7.19	7.12
11	0.100	2.25	2.21	2.17	2.12	2.10	2.08	2.05	2.04	2.03
	0.050	2.85	2.79	2.72	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.49
	0.010	4.54	4.40	4.25	4.10	4.01	3.94	3.86	3.81	3.78
	0.001	7.92	7.63	7.32	7.01	6.81	6.68	6.52	6.42	6.35
12	0.100	2.19	2.15	2.10	2.06	2.03	2.01	1.99	1.97	1.96
	0.050	2.75	2.69	2.62	2.54	2.50	2.47	2.43	2.40	2.38
	0.010	4.30	4.16	4.01	3.86	3.76	3.70	3.62	3.57	3.54
	0.001	7.29	7.00	6.71	6.40	6.22	6.09	5.93	5.83	5.76
13	0.100	2.14	2.10	2.05	2.01	1.98	1.96	1.93	1.92	1.90
	0.050	2.67	2.60	2.53	2.46	2.41	2.38	2.34	2.31	2.30
	0.010	4.10	3.96	3.82	3.66	3.57	3.51	3.43	3.38	3.34
	0.001	6.80	6.52	6.23	5.93	5.75	5.63	5.47	5.37	5.30
14	0.100	2.10	2.05	2.01	1.96	1.93	1.91	1.89	1.87	1.86
	0.050	2.60	2.53	2.46	2.39	2.34	2.31	2.27	2.24	2.22
	0.010	3.94	3.80	3.66	3.51	3.41	3.35	3.27	3.22	3.18
	0.001	6.40	6.13	5.85	5.56	5.38	5.25	5.10	5.00	4.94
15	0.100	2.06	2.02	1.97	1.92	1.89	1.87	1.85	1.83	1.82
	0.050	2.54	2.48	2.40	2.33	2.28	2.25	2.20	2.18	2.16
	0.010	3.80	3.67	3.52	3.37	3.28	3.21	3.13	3.08	3.05
	0.001	6.08	5.81	5.54	5.25	5.07	4.95	4.80	4.70	4.64
16	0.100	2.03	1.99	1.94	1.89	1.86	1.84	1.81	1.79	1.78
	0.050	2.49	2.42	2.35	2.28	2.23	2.19	2.15	2.12	2.11
	0.010	3.69	3.55	3.41	3.26	3.16	3.10	3.02	2.97	2.93
	0.001	5.81	5.55	5.27	4.99	4.82	4.70	4.54	4.45	4.39
17	0.100	2.00	1.96	1.91	1.86	1.83	1.81	1.78	1.76	1.75
	0.050	2.45	2.38	2.31	2.23	2.18	2.15	2.10	2.08	2.06
	0.010	3.59	3.46	3.31	3.16	3.07	3.00	2.92	2.87	2.83
	0.001	5.58	5.32	5.05	4.78	4.60	4.48	4.33	4.24	4.18
18	0.100	1.98	1.93	1.89	1.84	1.80	1.78	1.75	1.74	1.72
	0.050	2.41	2.34	2.27	2.19	2.14	2.11	2.06	2.04	2.02
	0.010	3.51	3.37	3.23	3.08	2.98	2.92	2.84	2.78	2.75
	0.001	5.39	5.13	4.87	4.59	4.42	4.30	4.15	4.06	4.00
19	0.100	1.96	1.91	1.86	1.81	1.78	1.76	1.73	1.71	1.70
	0.050	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	2.00	1.98
	0.010	3.43	3.30	3.15	3.00	2.91	2.84	2.76	2.71	2.67
	0.001	5.22	4.97	4.70	4.43	4.26	4.14	3.99	3.90	3.84
20	0.100	1.94	1.89	1.84	1.79	1.76	1.74	1.71	1.69	1.68
	0.050	2.35	2.28	2.20	2.12	2.07	2.04	1.99	1.97	1.95
	0.010	3.37	3.23	3.09	2.94	2.84	2.78	2.69	2.64	2.61
	0.001	5.08	4.82	4.56	4.29	4.12	4.00	3.86	3.77	3.70

Continuación del anexo 1

ν_2	α	ν_1								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
21	0.100	2.96	2.57	2.36	2.23	2.14	2.08	2.02	1.98	1.95
	0.050	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
	0.010	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40
	0.001	14.59	9.77	7.94	6.95	6.32	5.88	5.56	5.31	5.11
22	0.100	2.95	2.56	2.35	2.22	2.13	2.06	2.01	1.97	1.93
	0.050	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
	0.010	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35
	0.001	14.38	9.61	7.80	6.81	6.19	5.76	5.44	5.19	4.99
23	0.100	2.94	2.55	2.34	2.21	2.11	2.05	1.99	1.95	1.92
	0.050	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
	0.010	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30
	0.001	14.20	9.47	7.67	6.70	6.08	5.65	5.33	5.09	4.89
24	0.100	2.93	2.54	2.33	2.19	2.10	2.04	1.98	1.94	1.91
	0.050	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
	0.010	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26
	0.001	14.03	9.34	7.55	6.59	5.98	5.55	5.23	4.99	4.80
25	0.100	2.92	2.53	2.32	2.18	2.09	2.02	1.97	1.93	1.89
	0.050	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
	0.010	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22
	0.001	13.88	9.22	7.45	6.49	5.89	5.46	5.15	4.91	4.71
26	0.100	2.91	2.52	2.31	2.17	2.08	2.01	1.96	1.92	1.88
	0.050	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
	0.010	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18
	0.001	13.74	9.12	7.36	6.41	5.80	5.38	5.07	4.83	4.64
27	0.100	2.90	2.51	2.30	2.17	2.07	2.00	1.95	1.91	1.87
	0.050	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
	0.010	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15
	0.001	13.61	9.02	7.27	6.33	5.73	5.31	5.00	4.76	4.57
28	0.100	2.89	2.50	2.29	2.16	2.06	2.00	1.94	1.90	1.87
	0.050	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
	0.010	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12
	0.001	13.50	8.93	7.19	6.25	5.66	5.24	4.93	4.69	4.50
29	0.100	2.89	2.50	2.28	2.15	2.06	1.99	1.93	1.89	1.86
	0.050	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
	0.010	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09
	0.001	13.39	8.85	7.12	6.19	5.59	5.18	4.87	4.64	4.45
30	0.100	2.88	2.49	2.28	2.14	2.05	1.98	1.93	1.88	1.85
	0.050	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
	0.010	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07
	0.001	13.29	8.77	7.05	6.12	5.53	5.12	4.82	4.58	4.39
31	0.100	2.87	2.48	2.27	2.14	2.04	1.97	1.92	1.88	1.84
	0.050	4.16	3.30	2.91	2.68	2.52	2.41	2.32	2.25	2.20
	0.010	7.53	5.36	4.48	3.99	3.67	3.45	3.28	3.15	3.04
	0.001	13.20	8.70	6.99	6.07	5.48	5.07	4.77	4.53	4.34

Continuación del anexo 1

ν_2	α	ν_1								
		10	12	15	20	25	30	40	50	60
21	0.100	1.92	1.87	1.83	1.78	1.74	1.72	1.69	1.67	1.66
	0.050	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.92
	0.010	3.31	3.17	3.03	2.88	2.79	2.72	2.64	2.58	2.55
	0.001	4.95	4.70	4.44	4.17	4.00	3.88	3.74	3.64	3.58
22	0.100	1.90	1.86	1.81	1.76	1.73	1.70	1.67	1.65	1.64
	0.050	2.30	2.23	2.15	2.07	2.02	1.98	1.94	1.91	1.89
	0.010	3.26	3.12	2.98	2.83	2.73	2.67	2.58	2.53	2.50
	0.001	4.83	4.58	4.33	4.06	3.89	3.78	3.63	3.54	3.48
23	0.100	1.89	1.84	1.80	1.74	1.71	1.69	1.66	1.64	1.62
	0.050	2.27	2.20	2.13	2.05	2.00	1.96	1.91	1.88	1.86
	0.010	3.21	3.07	2.93	2.78	2.69	2.62	2.54	2.48	2.45
	0.001	4.73	4.48	4.23	3.96	3.79	3.68	3.53	3.44	3.38
24	0.100	1.88	1.83	1.78	1.73	1.70	1.67	1.64	1.62	1.61
	0.050	2.25	2.18	2.11	2.03	1.97	1.94	1.89	1.86	1.84
	0.010	3.17	3.03	2.89	2.74	2.64	2.58	2.49	2.44	2.40
	0.001	4.64	4.39	4.14	3.87	3.71	3.59	3.45	3.36	3.29
25	0.100	1.87	1.82	1.77	1.72	1.68	1.66	1.63	1.61	1.59
	0.050	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.84	1.82
	0.010	3.13	2.99	2.85	2.70	2.60	2.54	2.45	2.40	2.36
	0.001	4.56	4.31	4.06	3.79	3.63	3.52	3.37	3.28	3.22
26	0.100	1.86	1.81	1.76	1.71	1.67	1.65	1.61	1.59	1.58
	0.050	2.22	2.15	2.07	1.99	1.94	1.90	1.85	1.82	1.80
	0.010	3.09	2.96	2.81	2.66	2.57	2.50	2.42	2.36	2.33
	0.001	4.48	4.24	3.99	3.72	3.56	3.44	3.30	3.21	3.15
27	0.100	1.85	1.80	1.75	1.70	1.66	1.64	1.60	1.58	1.57
	0.050	2.20	2.13	2.06	1.97	1.92	1.88	1.84	1.81	1.79
	0.010	3.06	2.93	2.78	2.63	2.54	2.47	2.38	2.33	2.29
	0.001	4.41	4.17	3.92	3.66	3.49	3.38	3.23	3.14	3.08
28	0.100	1.84	1.79	1.74	1.69	1.65	1.63	1.59	1.57	1.56
	0.050	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.79	1.77
	0.010	3.03	2.90	2.75	2.60	2.51	2.44	2.35	2.30	2.26
	0.001	4.35	4.11	3.86	3.60	3.43	3.32	3.18	3.09	3.02
29	0.100	1.83	1.78	1.73	1.68	1.64	1.62	1.58	1.56	1.55
	0.050	2.18	2.10	2.03	1.94	1.89	1.85	1.81	1.77	1.75
	0.010	3.00	2.87	2.73	2.57	2.48	2.41	2.33	2.27	2.23
	0.001	4.29	4.05	3.80	3.54	3.38	3.27	3.12	3.03	2.97
30	0.100	1.82	1.77	1.72	1.67	1.63	1.61	1.57	1.55	1.54
	0.050	2.16	2.09	2.01	1.93	1.88	1.84	1.79	1.76	1.74
	0.010	2.98	2.84	2.70	2.55	2.45	2.39	2.30	2.25	2.21
	0.001	4.24	4.00	3.75	3.49	3.33	3.22	3.07	2.98	2.92
31	0.100	1.81	1.77	1.71	1.66	1.62	1.60	1.56	1.54	1.53
	0.050	2.15	2.08	2.00	1.92	1.87	1.83	1.78	1.75	1.73
	0.010	2.96	2.82	2.68	2.52	2.43	2.36	2.27	2.22	2.18
	0.001	4.19	3.95	3.71	3.45	3.28	3.17	3.03	2.94	2.87

Fuente: NAVIDI, William. *Statistics for engineers and scientists*. p. 819.

2. Tabla de relación densidad relativa - grados Brix

ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx
1,0000	0,000	1,0064	1,641	1,0128	3,270	1,0192	4,880
1,0002	0,052	1,0066	1,693	1,0130	3,321	1,0194	4,930
1,0004	0,103	1,0068	1,744	1,0132	3,371	1,0196	4,980
1,0006	0,154	1,0070	1,795	1,0134	3,421	1,0198	5,030
1,0008	0,206	1,0072	1,846	1,0136	3,472	1,0200	5,080
1,0010	0,257	1,0074	1,897	1,0138	3,523	1,0202	5,130
1,0012	0,309	1,0076	1,948	1,0140	3,573	1,0204	5,180
1,0014	0,360	1,0078	1,999	1,0142	3,624	1,0206	5,230
1,0016	0,411	1,0080	2,053	1,0144	3,674	1,0208	5,280
1,0018	0,463	1,0082	2,101	1,0146	3,725	1,0210	5,330
1,0020	0,514	1,0084	2,152	1,0148	3,775	1,0212	5,380
1,0022	0,565	1,0086	2,203	1,0150	3,826	1,0214	5,430
1,0024	0,616	1,0088	2,254	1,0152	3,876	1,0216	5,480
1,0026	0,668	1,0090	2,304	1,0154	3,926	1,0218	5,530
1,0028	0,719	1,0092	2,356	1,0156	3,977	1,0220	5,580
1,0030	0,770	1,0094	2,407	1,0158	4,027	1,0222	5,629
1,0032	0,821	1,0096	2,458	1,0160	4,077	1,0224	5,679
1,0034	0,872	1,0098	2,508	1,0162	4,128	1,0226	5,729
1,0036	0,924	1,0100	2,560	1,0164	4,178	1,0228	5,779
1,0038	0,975	1,0102	2,610	1,0166	4,228	1,0230	5,828
1,0040	1,026	1,0104	2,661	1,0168	4,278	1,0232	5,878
1,0042	1,078	1,0106	2,712	1,0170	4,329	1,0234	5,928
1,0044	1,129	1,0108	2,763	1,0172	4,379	1,0236	5,977
1,0046	1,180	1,0110	2,814	1,0174	4,429	1,0238	6,027
1,0048	1,232	1,0112	2,864	1,0176	4,479	1,0240	6,077
1,0050	1,283	1,0114	2,915	1,0178	4,529	1,0242	6,126
1,0052	1,334	1,0116	2,966	1,0180	4,580	1,0244	6,176
1,0054	1,385	1,0118	3,017	1,0182	4,630	1,0246	6,225
1,0056	1,437	1,0120	3,067	1,0184	4,680	1,0248	6,275
1,0058	1,488	1,0122	3,118	1,0186	4,730	1,0250	6,325
1,0060	1,539	1,0124	3,169	1,0188	4,780	1,0252	6,374
1,0062	1,590	1,0126	3,219	1,0190	4,830	1,0254	6,424

Continuación del anexo 2

ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx	ρ_r (20°/20°)	°Bx
1,0256	6,473	1,0320	8,048	1,0384	9,606	1,0448	11,147
1,0258	6,523	1,0322	8,098	1,0386	9,655	1,0450	11,195
1,0260	6,572	1,0324	8,146	1,0388	9,703	1,0452	11,243
1,0262	6,621	1,0326	8,195	1,0390	9,751	1,0454	11,291
1,0264	6,671	1,0328	8,244	1,0392	9,800	1,0456	11,339
1,0266	6,720	1,0330	8,293	1,0394	9,848	1,0458	11,387
1,0268	6,770	1,0332	8,342	1,0396	9,873	1,0460	11,435
1,0270	6,819	1,0334	8,391	1,0398	9,945	1,0462	11,482
1,0272	6,868	1,0336	8,439	1,0400	9,993	1,0464	11,530
1,0274	6,918	1,0338	8,488	1,0402	10,042	1,0466	11,578
1,0276	6,967	1,0340	8,537	1,0404	10,090	1,0468	11,626
1,0278	7,017	1,0342	8,586	1,0406	10,138	1,0470	11,673
1,0280	7,066	1,0344	8,634	1,0408	10,186	1,0472	11,721
1,0282	7,115	1,0346	8,683	1,0410	10,234	1,0474	11,768
1,0284	7,164	1,0348	8,732	1,0412	10,283	1,0476	11,816
1,0286	7,214	1,0350	8,781	1,0414	10,331	1,0478	11,864
1,0288	7,263	1,0352	8,830	1,0416	10,379	1,0480	11,912
1,0290	7,312	1,0354	8,878	1,0418	10,427	1,0482	11,959
1,0292	7,361	1,0356	8,927	1,0420	10,475	1,0484	12,007
1,0294	7,411	1,0358	8,975	1,0422	10,523	1,0486	12,054
1,0296	7,460	1,0360	9,024	1,0424	10,571	1,0488	12,102
1,0298	7,509	1,0362	9,073	1,0426	10,620	1,0490	12,150
1,0300	7,558	1,0364	9,121	1,0428	10,668	1,0492	12,197
1,0302	7,607	1,0366	9,170	1,0430	10,716	1,0494	12,245
1,0304	7,656	1,0368	9,218	1,0432	10,764	1,0496	12,292
1,0306	7,705	1,0370	9,267	1,0434	10,812	1,0498	12,340
1,0308	7,754	1,0372	9,316	1,0436	10,860	1,0500	12,387
1,0310	7,803	1,0374	9,364	1,0438	10,908	1,0502	12,435
1,0312	7,853	1,0376	9,413	1,0440	10,956	1,0504	12,482
1,0314	7,901	1,0378	9,461	1,0442	11,004	1,0506	12,530
1,0316	7,950	1,0380	9,509	1,0444	11,051	1,0508	12,577
1,0318	8,000	1,0382	9,558	1,0446	11,100	1,0510	12,624

Fuente: *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*. HORWITZ, William (ed.).
Official method 970.90.