



ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN DE KÉFIR DE AGUA DE PIÑA CON TIBICOS STUDY OF THE FERMENTATION OF PINEAPPLE WATER KEFIR WITH TIBICOS

J.P. López-Rojo¹, S. García-Pinilla², H. Hernández-Sánchez², M. Cornejo-Mazón^{1*}

¹Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Carpio y Plan de Ayala, S/N Santo Tomás c.p. 11340 Ciudad de México.

²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Carpio y Plan de Ayala, S/N Santo Tomás c.p. 11340 Ciudad de México.

Recibido 13 de Enero de 2017; Aceptado 24 de Enero de 2017

Resumen

Los tibicos son macro-colonias de microbioglea útiles para la elaboración de kéfir a partir de agua de piña y otros sustratos. En este trabajo se estudió la cinética de la fermentación de kéfir de agua de piña y la producción de biomasa obtenida a las 53 h fue de 36.7 g que correspondieron a un incremento del 74.6% respecto al valor inicial, con un pH de 4.67 ± 0.02 . Al finalizar la fermentación, se obtuvo una reducción de 1.55 unidades de pH, debido al crecimiento de los tibicos y a la consecuente producción de etanol, favoreciendo la acidificación del medio. Durante la fermentación, se produce ácido láctico, obteniendo 0.477 g de ácido láctico/100 mL y su cinética de producción, se ajustó a un modelo de primer orden con una $R^2 = 0.989$, $k = 5.49 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 12.62 \text{ h}$. Se obtuvo una relación lineal entre la tasa de producción de fenoles totales y la tasa de cambio de la actividad antioxidante lo que indicó que los fenoles proveen, principalmente, la actividad antioxidante pues durante la fermentación, éstos son liberados quedando disponibles. Se encontró un mayor número de colonias en la microbioglea que en el kéfir de agua.

Palabras clave: tibicos, kéfir, cinética de fermentación, actividad antioxidante.

Abstract

Tibicos are macro-colonies of microbioglea useful for elaboration of kefir from pineapple water. In this work, the kinetics of the fermentation was studied and the biomass produced at 53 h of fermentation was 36.7g that correspond to a 74.6% of the initial value, with a pH of 4.67 ± 0.02 . A reduction of 1.55 pH unit was achieved at the end of the fermentation, due to growth of tibicos and production of ethanol. During fermentation, lactic acid was produced reaching a value of 0.477g lactic acid/100mL and the kinetics was described with a first order model with $R^2 = 0.989$, $k = 5.49 \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 12.62 \text{ h}$. A linear relation between total rate of production of phenols and the rate of change of antioxidant activity was found indicating that phenols mainly provide the antioxidant activity since during fermentation they are liberated and becoming available. A higher number of colonies were found in the microbioglea than in the kefir.

Keywords: tibicos, kefir, fermentation kinetics, antioxidant activity.

1 Introducción

Mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido, Moinas *et al.* (1980) dilucidaron la estructura de los granos de tibicos y establecieron que los tibicos están formados por una capa externa compacta y una estructura interna esponjosa. La primera está densamente poblada por *Lactobacillus*, *Streptococcus* y levaduras que se embeben en una dextrana.

Los tibicos están constituidos por una matriz de polisacáridos, generalmente dextranas, dispuestos en dos capas, la externa es compacta y en ella se

encuentran embebidas bacterias y levaduras, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debida a la acumulación de CO_2 producido durante la fermentación (Lutz, 1999).

El complejo tibi produce un polisacárido que se encuentra constituido solo por D-glucosa, la dextrana del tibi está constituida principalmente por polímeros del tipo D-1,6-glucopiranosil; la dextrana es insoluble y la produce el complejo tibi especialmente el *Lactobacillus brevis* (Horisberger, 1969).

* Autor para la correspondencia. E-mail: maribepabe2@hotmail.com
Tel 57296000 ext 62314

Los tибicos pueden fermentar en diversos líquidos azucarados, alimentándose del azúcar para producir ácido láctico, etanol y dióxido de carbono, lo que hace que el agua esté carbonatada (Leroi y Pidoux, 1993). Las levaduras oxidan el azúcar y producen alcohol mientras que las bacterias oxidan el alcohol para dar lugar a ácido acético además de otros productos secundarios. Los tибicos fermentan el sustrato sobre todo si contiene sacarosa y los aromas únicos de las bebidas alcohólicas producidas por levaduras, con algunas excepciones son, frecuentemente, el resultado de los componentes mencionados anteriormente (Noble, 1978; Gamero *et al.*, 2013).

Los compuestos con grupos carbonilo, azufre y varios compuestos fenólicos son otros tipos de subproductos de la fermentación con levadura que afectan el aroma de las bebidas alcohólicas (Suomalainen y Lehtonen 1979). Los compuestos carbonilo de gran interés son los aldehídos que son intermediarios en la formación de alcoholes. El diacetilo y 2,3-pentanodiona se forman durante la fermentación por la descarboxilación de los ácidos α -acetoláctico y α -aceto- α -hidroxibutírico (Suomalainen y Lehtonen, 1979). Estos compuestos, contribuyen al aroma en productos fermentados (Tressl *et al.*, 1980). Los compuestos fenólicos producidos durante una fermentación alcohólica con levaduras son derivados de la catálisis del ácido p-cumárico, ácido ferúlico y vanillina (Ettayebi *et al.* 2003; Meaden 1998; Suomalainen y Lehtonen 1979). Los productos fenólicos formados por la acción de la levadura son, 4-etilfenol, 4-etilguayacol, y 4-metil guayacol (Suomalainen y Lehtonen 1979).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la cinética de kéfir de piña fermentado por tибicos, así como estudiar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de este producto.

2 Materiales and métodos

2.1 Producción de biomasa

Los tибicos fueron adquiridos en el Estado de México e hidratados en un matraz de 3 litros al que se le adicionó como sustrato piloncillo 5% p/v. La fermentación se realizó por 72 h (Villegas *et al.*, 2016).

2.2 Cinética de fermentación a partir de agua con piña

Para la elaboración del medio (Camacho-Ruiz *et al.*, 2016), se pesaron 12.5 g de azúcar mascabada y se agregaron a 237.5 mL de agua potable en un frasco de 1000 mL. Se adicionaron 2 g de piña (4 piezas) y 12 g de tибicos. A partir del lote madre se realizaron 8 fermentaciones por lote por duplicado y posteriormente se llevó a cabo la cinética, misma que se realizó durante 53 h con toma de muestras a las 0, 6, 10, 23, 29, 33, 48 y 53 h.

2.3 Análisis fisicoquímico de kéfir de agua

2.3.1 Determinación de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix)

Se realizó de acuerdo a la NMX-F-436-SCFI-2011 usando un refractómetro ATAGO modelo 57687 (Japón) y se basa en obtener el índice de refracción de soluciones que contengan principalmente sacarosa.

2.3.2 Determinación de pH

Se determinó de acuerdo a la norma NMX-F-317-S-1978 y se realizó directamente del fermentado con un potenciómetro (HACH Sens ion 1, modelo: 51700-23, code: 1012 s/n 0C210092. China, Electrodo: HANNA instruments, part code: HI 1332B, Cot. Nr: 15324).

2.3.3 Determinación de acidez titulable

Se tomaron 5 mL de kéfir en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionaron 35 mL de agua destilada con 2 gotas de fenolftaleína. La titulación se realizó con NaOH 0.01 N hasta pH de 7 y se registró el volumen utilizado de NaOH por muestra (Rubio *et al.*, 1993). La acidez titulable se expresó como g de ácido láctico/100 mL utilizando la Ecuación 1.

$$\frac{\text{g ácido láctico}}{100 \text{ ml}} = \frac{\text{mL NaOH} * \text{N NaOH (meq/mL)} * \text{pEq}}{\text{Alícuota} * 1000} \quad (1)$$

Donde: mL NaOH es el gasto de NaOH; N NaOH es la normalidad del NaOH; pEq es el peso equivalente de ácido láctico (0.09 g/meq) y la alícuota utilizada fue de 5 mL.

Se siguió la cinética de primer orden de incremento de acidez titulable, misma que fue ajustada según el modelo dado por la Ecuación (2).

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt \quad (2)$$

En la que [A] es la concentración de A al tiempo t, $[A]_0$ es la concentración inicial de A, k es la constante de velocidad de reacción y t es el tiempo de reacción.

Asimismo, se obtuvo el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la concentración inicial A (Ec. 2) que indica el tiempo en el que A, reduce su concentración en un 50% de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (3)$$

2.3.4 Producción de etanol

Se determinó de acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995 con modificaciones. Se tomaron 100 mL de muestra en un sistema de destilación. El destilado se midió y aforó a 100 mL con agua destilada. Posteriormente se midió la concentración de alcohol con un alcoholímetro con escala °Gay Lussac a 20 °C. La lectura obtenida se convirtió a mg etanol/mL utilizando la densidad del etanol (0.789 g/mL).

2.4 Actividad antioxidante y contenido fenólico

El método empleado fue propuesto por Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones de Mishra *et al.* (2012). Se tomaron 10 mL del caldo de fermentación por cada punto de la cinética y se evaporaron al vacío a 45°C hasta un volumen final de 3 mL (Espinosa-Velázquez *et al.*, 2016; Gómez-Sampedro y Zapata-Montoya, 2016). Se realizó una dilución 1:1 de metanol y HCOOH al 3% mismos que se sonicaron a una frecuencia de 20.5 kHz por 10 min, posteriormente fueron agitados por 30 min y finalmente centrifugados por 10 min a 3250 rpm. El sobrenadante se evaporó al vacío a 35°C hasta un volumen final de 3 mL. Los extractos se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta su uso. Previo a la determinación de actividad antioxidante por DPPH y contenido de compuestos fenólicos, los extractos se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min.

2.4.1 Determinación de actividad antioxidante por DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Los extractos fueron filtrados a través de discos con porosidad de 45 μ m. La reacción se inició adicionando una solución de DPPH (50 μ M) en metanol con 1 mL del extracto y se mantuvo a 25°C por 30 min en la oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 717 nm (Hernández-Carrillo *et al.*, 2015). Como blanco se utilizó metanol al 80%. Se calculó el

porcentaje de inhibición a partir de la Ecuación 4. La curva estándar fue construida con Trolox y el resultado se reporta en μ moles equivalentes de Trolox/mL.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Abs_C - Abs_M}{Abs_C} \right) * 100\% \quad (4)$$

Donde Abs_C es la absorbancia control y Abs_M de la muestra.

2.4.2 Determinación de fenoles totales

Se empleó la técnica colorimétrica propuesta por Singleton y Rossi (1965) con modificaciones por Cerón-Montes *et al.* (2015). Se colocaron 200 μ L de muestra y 200 μ L del reactivo Folín Ciocalteu, dejando reaccionar por 6 minutos y se detuvo la reacción adicionando 4 mL de bicarbonato de sodio al 2 %. La solución se dejó reposar por 30 minutos. Al término de este tiempo se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer lambda 35. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico y se reportaron los equivalentes de ácido gálico (EAG).

2.5 Microbiología del kéfir de agua de piña y microbioglea

2.5.1 Determinación de microbioglea

Se tomaron 1 mL de los tibicos y kéfir a las 29 h de fermentación para el análisis morfológico. Las diluciones de los tibicos se realizaron hidratando 1 g en agua peptonada estéril al 0.1% (Escobedo, 2014). Para la determinación de la microbioglea se realizaron diluciones seriadas y se inoculó 1 mL por dilución durante 37 h.

2.5.2 Identificación de bacterias aerobias

Se identificaron de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994. Se inocularon por duplicado muestras de tibicos y kéfir preparadas según la NOM-110-SSA1-1994. La siembra se realizó por el método de rastrillo en Agar Cuenta Estándar (ACE) y se dejó un blanco sin sembrar como control. La incubación fue en posición invertida por 48 h a 37°C (NOM-092-SSA1-1994).

2.5.3 Identificación de hongos y levaduras

Se realizó de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994. 1 mL de la muestra líquida se colocó por duplicado en cajas Petri. Se vertieron de 15 a 20 mL de medio Agar Papa Dextrosa (PDA) acidificado a un pH de 3.5

y se dejó un blanco como control. La incubación se realizó por método de rastrillo por 3, 4 y 5 días y para la identificación se utilizaron las placas conteniendo entre 10 y 150 colonias.

2.5.4 Identificación de bacterias ácido-lácticas

Se llevó a cabo de acuerdo al método de Rubio *et al.* (2014) con modificaciones. Se empleó el agar MRS adicionando 1 mL y se incubó a 36°C por 48 h. Se mantuvo un blanco como control.

2.6 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como media \pm error estándar. Se llevó a cabo un ANOVA utilizando el software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., EE.UU.), el nivel de significancia para cada prueba fue $2\alpha = 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Design Expert y XLSTAT.

3 Resultados y discusiones

3.1 Producción de biomasa del fermentado de tибicos en agua de piña

Como se observa en la Figura 1, la producción de biomasa obtenida a las 53 h fue del 36.7 g que corresponden a un incremento del 74.6% respecto al valor inicial, con un pH de 4.67 ± 0.02 . Stadie *et al.* (2013) reportan que el pH óptimo para el crecimiento de tибicos es cercano a 4.0. Horisberger (1969) reportó que, durante la fermentación, los tибicos forman dextranas con los azúcares presentes en el medio, por lo que la disponibilidad de los azúcares en la piña facilita la producción de biomasa. Por otro lado, Reib (1990) observó que, a los 18 días de fermentación con higos, la producción de biomasa de los tибicos alcanzó un 70% del valor inicial, lo que indica que es más eficiente la producción de biomasa en piña que en higos pues se realizó en un tiempo considerablemente más corto. Asimismo, el porcentaje de humedad encontrado en nuestro producto fue del $83.83 \pm 0.12\%$ que es similar al reportado por Ulloa y Herrera (1981).

3.2 Análisis fisicoquímico del kéfir de agua

En la Figura 2, se observa el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) durante la fermentación de tибicos en piña.

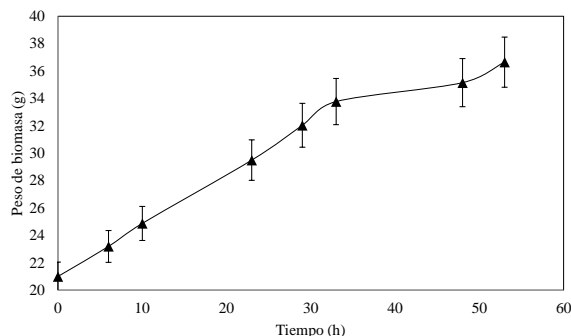


Fig. 1. Producción de biomasa de tибicos en agua de piña.

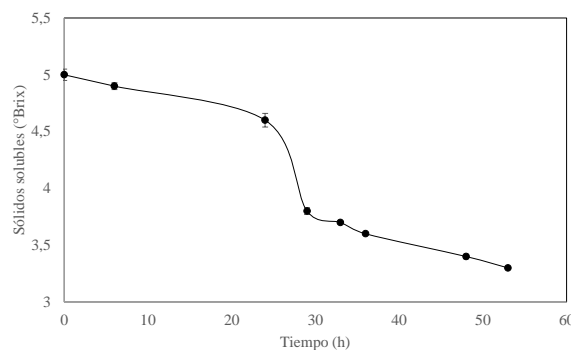


Fig. 2. Variación de sólidos solubles del kéfir de agua de piña.

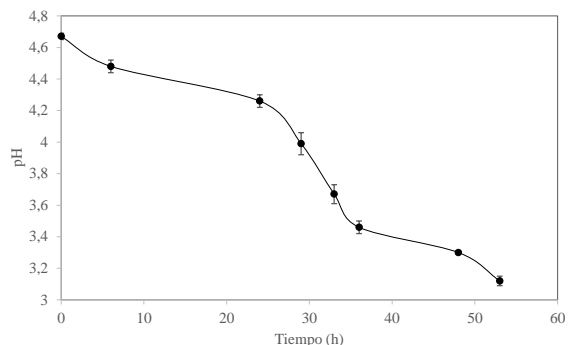


Fig. 3. Variación de pH del kéfir de agua de piña.

Durante las 53 h de fermentación se presentó una disminución de 1.71% $^{\circ}$ Brix (de 5.03 a 3.32) debido al uso de los azúcares como sustrato durante la fermentación (Rubio, 1993).

En la Figura 3, se observa la variación de pH durante la fermentación. Al finalizar la misma se obtuvo una reducción de 1.55 unidades de pH, debido al crecimiento de los tибicos y a la consecuente producción de etanol, favoreciendo la acidificación del medio. El pH en medios con fruta como la piña, disminuye debido a la formación de ácido láctico y acético a partir de etanol (Rubio, 1991; Liu, 2011).

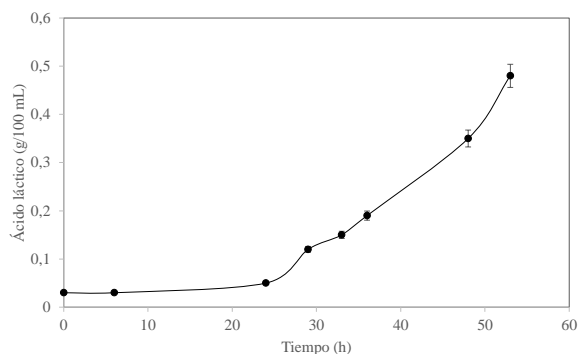


Fig. 4. Producción de ácido láctico del kéfir de agua de piña.

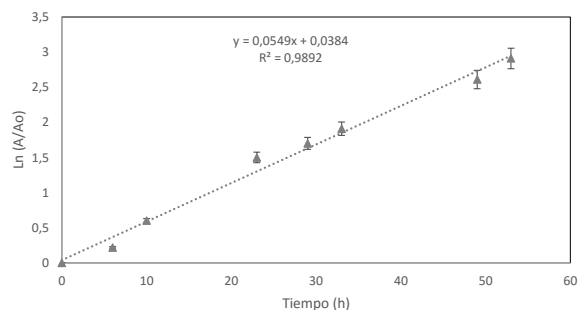


Fig. 5. Modelo matemático de la cinética de primer orden aplicado a la producción de ácido láctico en el kéfir de agua de piña.

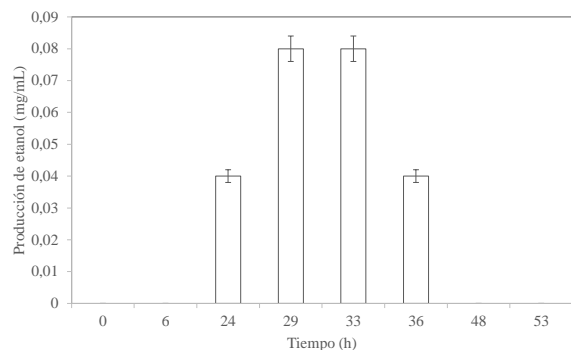


Fig. 6. Producción de etanol en el kéfir de agua de piña.

La variación de acidez titulable durante la fermentación, se observa en la Figura 4. Durante la fermentación, se produce ácido láctico, obteniendo 0.477 g de ácido láctico/100 mL. Estudios reportados de fermentados de piloncillo muestran una acidez de 0.34 g de ácido láctico/100 mL (Radazzo *et al.*, 2016) que es menor a la obtenida en agua de piña. La cinética se ajustó a una cinética de primer orden con una $R^2 = 0.989$ (Figura 5) y los parámetros correspondientes a la producción de ácido láctico durante la cinética de fermentación (Ec. 2 y Ec. 3) fueron, $k = 5.49 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 12.62 \text{ h}$.

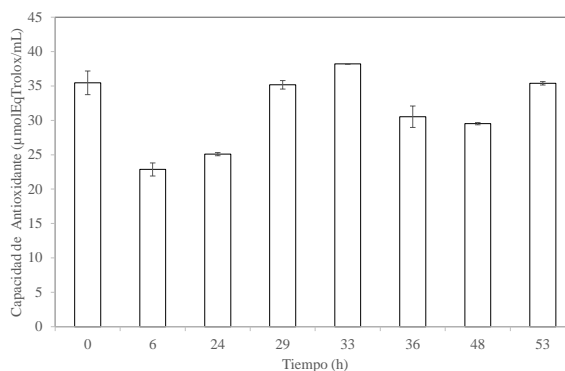


Fig. 7. Variación de la actividad antioxidante del kéfir de agua de piña.

La producción de etanol (Figura 6) fue de 0.08 mg/mL a las 29 h de fermentación. El tiempo al cual se encontró la concentración máxima depende de la disponibilidad de los azúcares presentes en cada medio, pues de esto depende, el crecimiento de los microorganismos (Rubio *et al.*, 1993). Su producción se atribuye principalmente a la presencia de levaduras fermentadoras como *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii*, así como a las bacterias *B. polymyxa*, *B. coagulans*, y bacterias heterolácticas, que son capaces de producir etanol a partir de la fuente de carbono (Rubio *et al.*, 1993).

3.3 Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

La actividad antioxidante analizada por DPPH se observa en la Figura 7. Durante el tiempo de fermentado se observó una disminución de actividad antioxidante durante las primeras 24 horas y posteriormente un incremento hasta la actividad inicial debido a la concentración de ácido láctico, enzimas intracelulares y extracelulares (Domínguez-Hernández *et al.*, 2016) que varían durante la fermentación (Rubio *et al.*, 1993) y por la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos presentes en la piña (Hossain y Rahman, 2011; Pérez-Alonso *et al.*, 2015). Los resultados de Lin y Chang (2000) indican que la capacidad de eliminación de radicales de las células intactas y los extractos intracelulares de *B. longum* y *L. acidophilus* contribuyen al efecto antioxidante. Alsayadi *et al.* (2013) encontraron que las muestras de kéfir de agua presentan una excelente capacidad de captación de los radicales en comparación con otros estudios realizados con leche de soya, suero de leche, leche de vaca, leche de cabra y leche de arroz.

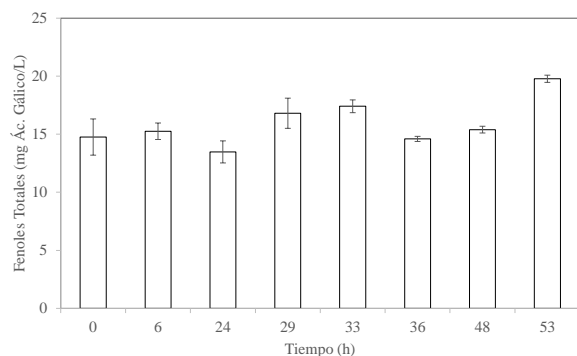


Fig. 8. Producción de fenoles totales en el kéfir de agua de piña.

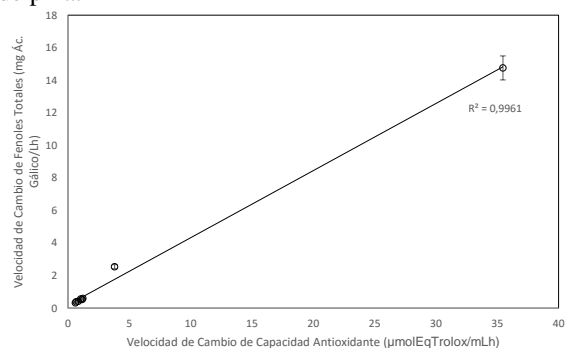


Fig. 9. Velocidad de cambio de capacidad antioxidante con relación a la velocidad de cambio del contenido de fenoles totales.

Los extractos libres de células en algunas cepas de bacterias ácido-lácticas han mostrado una actividad antioxidante con tasas de inhibición de la auto-oxidación de ascorbato (Alsayadi *et al.*, 2013). Mecanismos antioxidantes tales como la capacidad quelante de iones metálicos y el barrido de especies reactivas del oxígeno contribuyen a la actividad antioxidante (Lin y Yen, 1999).

En la Figura 8, se muestra la producción de fenoles totales durante las cinéticas de fermentación, con una concentración máxima de 19.78 ± 0.31 mg equivalentes de ácido gálico/L a las 53 h. Randazzo *et al.* (2016) desarrollaron bebidas fermentadas con tibicos para consumo moderado adicionado con jugos de frutos para cada bebida a los cuales les determinó la cantidad de fenoles totales dando como resultado 176.4 mg/L para el kéfir adicionado con jugo de manzana y 61.69 mg/L para kéfir adicionado con jugo de uva ambos expresados como mg equivalentes ácido gálico/L.

En la Figura 9 se muestra la relación entre la tasa de producción de fenoles totales y la tasa de cambio de la actividad antioxidante. Se obtuvo una relación lineal ($R^2 = 0.996$) lo que indicó que

los fenoles proveen, principalmente, la actividad antioxidante pues durante la fermentación, éstos son liberados quedando disponibles. Los bajos valores encontrados de concentración de fenoles pueden deberse a la poca fruta que se añade al medio y cuyos compuestos fenólicos se liberaron durante la fermentación, dejando expuestos los grupos hidroxilo. Las producciones de sabores fenólicos en bebidas fermentadas se atribuyen a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y otros géneros de levaduras como *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Dekkera*, y *Brettanomyces* que contribuyen a malos “sabores fenólicos” en productos vinícolas (Coghe *et al.* 2004; Edlin *et al.* 1995; Shinohara *et al.* 2000). Adicionalmente, los microorganismos que se han encontrado en tibicos son *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia radaisii*, *Brettanomyces intermedius*, *Bettanomyces clausenii*, *Candida guilliermondii*, *Candida valida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* (Ruíz-Oronoz, 1932; Estrada-Cuellar, 1985; Rubio *et al.*, 1993). Estos microorganismos pueden ser los responsables de la presencia de los fenoles en el kéfir de agua de tibicos.

3.4 Microbiología del kéfir de agua de piña

En la Tabla 1, se presenta la morfología colonial de las macrocolonias y microbioglea de kéfir de agua de piña en los medios de cultivos MRS, ACE y PDA. Las morfologías y crecimientos en la tercera dilución presentaron las mismas características entre la microbioglea y el kéfir, por lo que el kéfir albergó los mismos microorganismos que la microbioglea (Laureys y De Vuyst, 2014). La morfología observada correspondió a colonias de levaduras alargadas y redondas, así como a ascosporas con hifas.

Se encontró un mayor número de colonias en la microbioglea que en el kéfir de agua debido a que los tibicos están formados por una capa externa compacta y una estructura interna esponjosa. La primera está densamente poblada por bacterias y levaduras que se embeben en la dextrana, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO_2 producido durante la fermentación (Lutz, 1999; Moinas *et al.* 1980).

No obstante, la ausencia de *Lactobacillus* no se observó cómo lo reportó Ronald (2007), donde el complejo tibi produce un polisacárido de dextrana constituido principalmente por D-1,6-glucopiranosil, insoluble y producido por *Lactobacillus brevis*.

Tabla 1. Morfología colonial de la microbioglea y kéfir de agua de piña e incubada en medio MRS, ACE y PDA.

| | MRS | | ACE | | PDA | |
|------------------------|--------------|------------|--------------|------------|------------------------|------------------------|
| | Microbioglea | Kéfir | Microbioglea | Kéfir | Microbioglea | Kéfir |
| Dilución | -3 | -3 | -3 | -3 | -3 | -4 |
| Forma | Circular | Circular | Puntiforme | Puntiforme | Rizoide | Rizoide |
| Color | Crema | Crema | Crema | Crema | Rosa pálido | Rosa pálido |
| Borde | Entero | Entero | Entero | Entero | Ramoso | Ramoso |
| Superficie | Lisa | Lisa | Lisa | Lisa | Filamentosa | Filamentosa |
| Elevación | Convexa | Convexa | Convexa | Convexa | Convexa rugosa | Convexa rugosa |
| Luz reflejada | Traslucido | Traslucido | Mate | Mate | Mate | Mate |
| Luz transmitida | Opaco | Opaco | Opaco | Opaco | Opaco | Opaco |
| Aspecto | Húmedo | Húmedo | Húmedo | Húmedo | Seco | Seco |
| Tinción de Gram | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa | Negativa |
| Cristal violeta | NA | NA | NA | NA | Alargadas y circulares | Alargadas y circulares |

Man-Rogosa-Sharpe (MRS), Agar Cuenta Estándar (ACE), Papa Dextrosa Agar (PDA), No Aplica (NA).

Sin embargo, la manera de crecer bacterias ácido-lácticas es en un ambiente microaerófilo en medio MRS (Rubio *et al.* 1993). A su vez, el kéfir de agua es un medio muy demandante para el género *Lactobacillus* debido a su baja concentración de aminoácidos esenciales (Stadie *et al.*, 2013) limitando su crecimiento.

Microorganismos presentes en los tibicos como *Leuconostoc mesenteroides* (Pidoux, 1989) considerados seguros para la salud humana, son productores de dextranas (Duboc y Mollet, 2001). Las dextranas, producidas principalmente por *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y *Weissella*, difieren en el tipo de enlace glucosídico, edad, grado y tipo de ramificación, longitud de cadena, peso molecular, distribución y conformación de cadena polimérica. Esta variación es influenciada por la cepa, condiciones de cultivo y composición del medio (Yang *et al.*, 2015), por lo que en el kéfir de agua de piña es posible considerar la presencia de una mezcla de dichos microorganismos.

Conclusiones

Durante la fermentación por tibicos en agua de piña, se incrementó la biomasa inicial en 74.6%, alcanzando un pH de 4.67 ± 0.02 y una humedad de $83.83 \pm 0.12\%$. La concentración final de ácido láctico obtenida fue de 0.477 g de ácido láctico/100 mL y se produjo linealmente con un $R^2 = 0.989$. La producción de etanol fue de 0.08 mg/mL a las 29 h de fermentación con una actividad antioxidante de 19.78 ± 0.31 mg equivalentes de ácido gálico/L la cual no presentó diferencia significativa durante el fermentado. La relación de tasa de producción de fenoles totales y de cambio de actividad antioxidante fue lineal lo que

indicó que los fenoles proveen, principalmente, la actividad antioxidante pues durante la fermentación, éstos son liberados quedando disponibles. Se encontró un mayor número de colonias en la microbioglea que en el kéfir de agua.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACyT e IPN por otorgar financiamiento para la investigación.

Nomenclatura

| | |
|------------------|--|
| mL NaOH N NaOH | gasto de NaOH en mL normalidad de NaOH |
| pEq | peso equivalente de ácido láctico |
| Abs _C | absorbancia control |
| Abs _M | absorbancia de la muestra |

Referencias

- Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M., y Sabri, F. Z. (2013). Antioxidant potency of water kefir. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2, 2444.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Camacho-Ruiz, M.A., Camacho-Ruiz, R.M., Armendariz, M., Ramirez-Velasco, L., Asaff-Torres, A., Levasseur, A., Mateos-Diaz, J.C., y Rodriguez, J.A. (2016). Corn bran as potential substrate for high production of feruloyl and acetylxytan esterases by solid state

- fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 11-21.
- Cerón-Montes, G.I., San Martín-Martínez, E., Yañez-Fernández, J., Quezada-Cruz, M., y Castro-Muñoz, R. (2015). Preliminary purification of anthocyanins from blue corn by adsorption and electrophoresis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 99-108.
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., y Delvaux, F. R. (2004). Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 602-608.
- Domínguez-Hernández, C.R., García-Alvarado, M.A., García-Galindo, H.S., Salgado-Cervantes, M.A., y Beristáin, C.I. (2016). Stability, antioxidant capacity and bioavailability of nano-emulsified astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 457-468.
- Duboc, P., y Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal* 11, 759-768.
- Edlin, D. A., Narbad, A., Dickinson, J. R., y Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalous*. *FEMS Microbiology Letters* 125, 311-315.
- Escobedo, M. (2014). Aislamiento e identificación de levaduras de la bebida fermentada por los "tibicos". Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Pp: 132.
- Espinosa-Velázquez, R., Dorantes-Alvarez, R., Gutiérrez-López, G.F., García-Armenta, E., Sánchez-Segura, L., Perea-Flores, M.J., Ceballos-Reyes, G.M., y Ortíz Moreno, A. (2016). Morpho-structural description of unripe and ripe avocado pericarp (*Persea americana* mill var. *drymifolia*) description. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 469-480.
- Estrada-Cuellar, J. (1985). Estudio de las levaduras de los tibicos y de la madre del vinagre. Tesis Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M. A., Sendide, K., y Ettayebi, M. (2003). Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters* 223, 215-219.
- Gamero, A., Tronchoni, J., Querol, A., y Belloch, C. (2013). Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1405-1414.
- Gómez-Sampedro, L.J. y Zapata-Montoya, J.E. (2016). Obtaining of antioxidant peptide from bovine plasma hydrolysates and effect of the degree of hydrolysis on antioxidant capacity. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 101-109.
- Hernández-Carrillo, J.G., Valdez-Fragoso, A., Welti-Chanes, J., y Mújica-Paz, H. (2015). Tracing phenolic compounds through manufacturing of edible films from orange and grapefruit peels. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 567-578.
- Horisberger, M. (1969). Structure of the dextran of the tibi grain. *Carbohydrate Research* 10, 379-385.
- Hossain, M. A., y Rahman, S. M. (2011). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International* 44, 672-676.
- Laureys, D., y De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 2564-2572.
- Leroi, F., y Pidoux, M. (1993). Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 48-53.
- Lin, M. Y., y Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences* 45, 1617-1622.
- Lin, M. Y., y Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1460-1466.

- Liu, S. N., Han, Y., y Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International* 44, 643-651.
- Lutz, M. L. (1999). Recherches biologiques sur la consitution du tibi. *Bulletin Trimestriel de la Société de Mycologie Français* 15, 68-70.
- Meaden, P. (1998). Brewers' yeast. International Dairy Federation special issue 9801. Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects. *International Dairy Federation, Brussels, Belgium*, 162-172.
- Moinas, M., Horisberger, M., y Bauer, H. (1980). The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Archives of Microbiology* 128, 157-161.
- Mishra, K., Ojha, H. y Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036-1043.
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-436-SCFI-2011 Industria azucarera y alcoholera - determinación de grados Brix en jugos de especies vegetales productoras de azúcar y materiales azucarados - método del refractómetro.
- Noble, A. (1978). Aroma. In: Peterson MS, Johnson AH (ed.) *Encyclopedia of Food*. AVI, Westport, CT, USA, pp 50-51.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Pérez-Alonso, C., Campos-Montiel, R.G., Morales-Luna, E., Reyes-Munguía, A., Aguirre-Álvarez, G., y Pimentel-González D.J. (2015). Stabilization of phenolic compounds from *Opuntia oligacantha* forst by microencapsulation with agave sap (aguamiel). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 579-588.
- Pidoux, M. (1989). The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 5, 223-238.
- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H. y Settanni, L. (2016). Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology* 54, 40-51.
- Ronald, A. (2007). *Frutoterapia: Nutrición y Salud*. Editorial EDAF. Madrid
- Rubio M. T. (1991). Caracterización microbiológica y bioquímica de la fermentación de tibicos en piloncillo. Tesis de Biología. Facultad de ciencias. UNAM.
- Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., y Ulloa, M. (1993). Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 35, 19-31.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., y Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology* 38, 303-311.
- Ruiz-Oronoz, M. 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente como tibicos. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 3, 183-190.
- Shinohara, T., Kubodera, S., y Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 90-97.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.

- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., y Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology* 35, 92-98.
- Suomalainen, H., y Lehtonen, M. (1979). The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 85, 149-156.
- Tressl, R., Bahri, D., y Kossa, M. (1980). In: Charalambous G (ed) The analysis and control of less desirable flavors in foods and beverages. Academic, New York, USA, pp 293-318
- Ulloa, M., y Herrera, T. (1981). Estudio de *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras que constituyen parte de las zoogreas llamadas tíbicos en México.
- Ulloa, M., Herrera-Suárez, T., y Lappe-Oliveras, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México.
- Villegas, E., Téllez-Téllez, M., Rodríguez, A., Carreón-Palacios, A.E., Acosta-Urdapilleta, M.L., Kumar-Gupta, V., y Díaz-Godínez, G. (2016). Laccase activity of *Pycnoporus cinnabarinus* grown in different culture systems. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 703-710.
- Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., y Zhou, Z. (2015). Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydrate Polymers* 133, 365-372.