

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

Investigador:

Jaime Ernesto Catalán Garrido
iqcatalan@gmail.com
Ingeniero Químico

Asesor:

César Alfonso García Guerra
checha1gar@yahoo.com
Ingeniero Químico

RESUMEN

Este 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 aprovecharse como posible bebida probiótica. Para esto, se llevó a cabo un conjunto de fermentaciones durante 72 h, dentro de un sistema abierto sin agitación, sin aireación, a temperatura constante de 30 grados °C, conteniendo 200 mL de sustrato estéril y tres diferentes proporciones de inóculo. Dicho sustrato fue preparado a partir del corazón de la piña de la variedad Cayena lisa procedente de los subproductos de la manufactura de esta fruta en el departamento de Guatemala, mientras que los granos de tibicos fueron adquiridos mediante una familia particular residente en la ciudad de Guatemala. Asimismo, se cuantificaron diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos, con base en la proporción de inóculo y en función del tiempo de fermentación. Con base en los resultados obtenidos se estableció que el jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con granos de tibicos en una proporción de 0,030 g/mL, genera una posible bebida probiótica, en el período de las 24 a las 72 h de fermentación, bajo las condiciones experimentales planteadas.

Palabras clave: bebida probiótica, Cayena lisa, eje de la inflorescencia de la piña, fermentación, granos de tibicos, subproductos industriales.

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, durante la manufactura de esta fruta se generan diversos subproductos (corona, tallo, cáscara o recorte, y el corazón o eje de la inflorescencia) que en conjunto representan aproximadamente la mitad del peso total de la fruta cosechada, los cuales en su mayoría no son aprovechados y generalmente son depositados en una forma inadecuada, ocasionando un incremento en la cantidad de residuos sólidos.

Actualmente, debido al rápido crecimiento de la población y al aumento en la demanda de alimentos, la industria alimenticia se plantea dos retos: reducir la cantidad no aprovechada de alimentos y disminuir la cantidad de residuos generados.

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

Por estas razones, se fermentó el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (procedente de los subproductos de la manufactura de esta fruta) con

granos de tibicos, para aprovecharse como una bebida potencialmente probiótica, evaluando diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos, con base en la proporción de inóculo y en función del tiempo de fermentación.

METODOLOGÍA

La metodología cuantitativa fue dividida en tres fases: preparación, fermentación, y cuantificación.

Preparación

Debido a que en Guatemala no existe un lugar de venta de granos de tibicos, estos fueron obtenidos a través de una familia residente en la ciudad de Guatemala, siendo entonces necesario eliminar la influencia de las fermentaciones previas en estos, mediante su acondicionamiento 24 h antes de cada proceso de fermentación.

Por otro lado, el eje de la inflorescencia de la piña fue adquirido a partir de los residuos generados por la manufactura de la variedad Cayena lisa, con un contenido de azúcares superior a 8 °Bx.

Debido a que el jugo del corazón de la piña (sustrato) se encuentra dentro de una matriz densa de fibras, fue necesario separar mecánicamente el jugo para que los nutrientes estuvieran en contacto directo con los microorganismos, y aumentar así la eficiencia en el proceso de fermentación.

Dicho sustrato fue filtrado por medio de tela para evitar la interferencia de los sólidos en suspensión durante la etapa de cuantificación, y fue esterilizado en conjunto con los matraces Erlenmeyer utilizados como biorreactores.

Fermentación

Esta fase se llevó a cabo mediante la fermentación de 200 mL de sustrato preparado durante 72 h, inoculando el medio con tres diferentes concentraciones de granos de tibicos: 0,015, 0,030 y 0,060 g/mL.

Además, las series de fermentaciones fueron desarrolladas a 30 °C, en sistemas abiertos, sin agitación y sin aireación.

Cuantificación

Los parámetros evaluados se clasificaron en físicos, químicos, y microbiológicos, los cuales se determinaron en intervalos de 12 h desde el tiempo cero hasta las 72 h de fermentación, con excepción de los microbiológicos, los cuales se determinaron en intervalos de 24 horas.

Los muestreos correspondientes a los parámetros microbiológicos fueron realizados previo a los físicos y químicos, para evitar la contaminación de dichas muestras.

Las bacterias ácido-lácticas y las levaduras viables en el sustrato fermentado fueron contabilizadas a través de métodos cultivo-dependientes, utilizando agar MRS y agar YGC, respectivamente, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Después, los granos de tibicos fueron separados del medio fermentado por medio de un colador plástico de tamiz fino. Posteriormente el jugo fermentado del corazón de la piña fue enfriado hasta una temperatura ambiente de aproximadamente 19 °C, y fue agitado durante 5 minutos para eliminar el CO₂ presente.

La biomasa retenida en el tamiz fue lavada con agua potable y posteriormente se dejó drenar el exceso de agua por gravedad durante 2 minutos, para así obtener la biomasa drenada.

Para determinar la biomasa seca, los granos de tibicos drenados fueron sometidos a un proceso de secado dentro de un horno de convección natural a 90 °C durante 24 horas.

La densidad relativa del medio fermentado se determinó relacionando las masas de igual volumen de la muestra respecto a la del agua desmineralizada, utilizando un picnómetro, a temperatura ambiente.

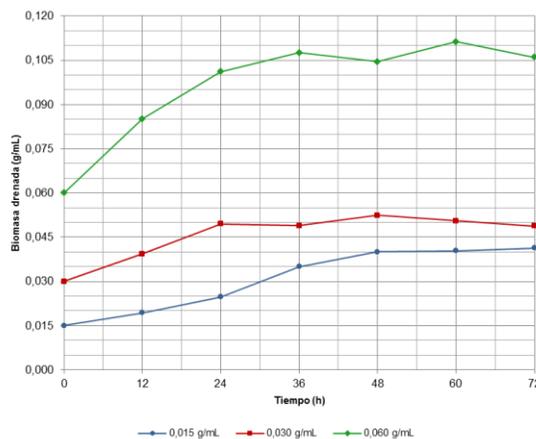
Para determinar la acidez activa (pH) se utilizó un potenciómetro calibrado, mientras que la acidez total titulable se determinó por medio de la titulación potenciométrica de una alícuota de 10 mL con una solución de NaOH estandarizado, calculando la segunda derivada de la curva de titulación para obtener el punto de equivalencia, expresando el resultado como su equivalente de ácido láctico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de la biomasa drenada

Los granos de tibicos drenados representan 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 y a que el exceso de líquido fue separado por gravedad.

Figura 1. Concentración de la biomasa drenada



Las curvas de la concentración de la biomasa drenada (figura 1) exhibieron un comportamiento similar a las curvas de la concentración de la biomasa seca (figura 2), pudiendo observarse en ambas que el crecimiento de la biomasa en función del tiempo de fermentación, fue dependiente de la cantidad de inóculo.

Asimismo, se observó un desplazamiento vertical positivo en función del tiempo de fermentación de las curvas de la concentración de la biomasa drenada respecto a las curvas de la concentración de la biomasa seca, generado por el incremento del contenido de agua en los granos de tibicos, ya que conforme los granos aumentaron en número y en tamaño, también aumentó la cantidad de líquido retenido 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 se correlacionó la concentración de la biomasa drenada con la concentración de la biomasa seca.

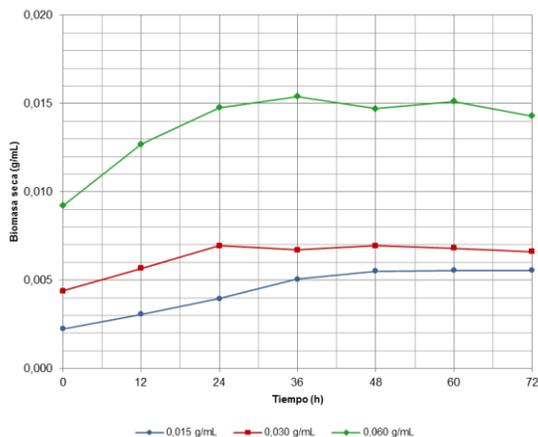
Por lo tanto, para analizar correctamente el comportamiento de los granos de tibicos durante el proceso de fermentación, fue necesario excluir la influencia de la humedad en los mismos.

Concentración de la biomasa seca

El comportamiento de las curvas de la concentración de la biomasa seca en función del tiempo de fermentación (figura 2) se ajustó al modelo

teórico del desarrollo microbiológico, pudiendo observarse en la mayoría de estas cuatro etapas: crecimiento, desaceleración, estacionaria, y declinación.

Figura 2. Concentración de la biomasa seca



Al inicio de los procesos de fermentación se observó un período de incremento constante en las curvas de la concentración de la biomasa seca, denominado como fase de crecimiento. No obstante, esta fase finalizó a las 36 h de fermentación al inocular el medio con granos de tибicos en proporción de 0,015 g/mL, a las 24 h al inocular en proporción de 0,030 g/mL, y a las 12 h al inocular en proporción de 0,060 g/mL.

Al finalizar la etapa de crecimiento se observó una fase de desaceleración, la cual tuvo una duración de 12 h al inocular el medio en proporciones de 0,015 y 0,060 g/mL. Sin embargo, no se pudo apreciar esta fase al inocular el medio en proporción de 0,030 g/mL.

Posteriormente, 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 el medio en proporción de 0,015 g/mL, la fase estacionaria tuvo una duración de 24 h, alcanzando la máxima concentración de la biomasa seca de 0,0154 g/mL a las 36 h; al inocular el medio en proporción de 0,030 g/mL esta fase tuvo una duración de 36 h, alcanzando la máxima concentración de biomasa seca de 0,0070 g/mL a las 24 y 48 h; y al inocular el medio en proporción de 0,060 g/mL dicha fase se prolongó durante 24 h, alcanzando la máxima concentración de biomasa seca de 0,0056 g/mL a las 60 h de fermentación.

Por último, se observó un período en el cual se redujo la concentración de la biomasa seca, denominado como fase de declinación. Esta etapa tuvo una duración de 12 h al inocular el medio en proporción de 0,030 g/mL, y una duración de 24 h al inocular el medio en proporción de 0,060 g/mL, mientras que no se observó dicha fase al inocular el medio en proporción de 0,015 g/mL.

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

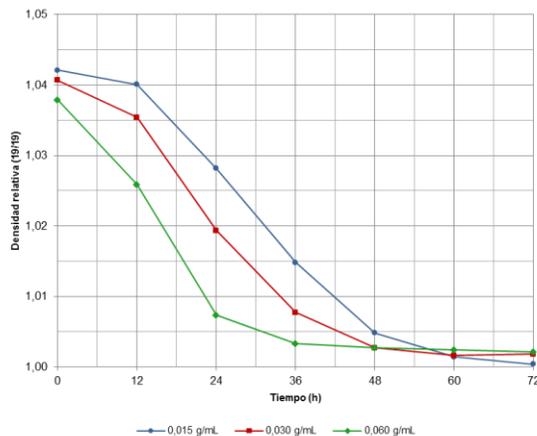
Esto se debe a que, a mayor proporción de microorganismos, mayor es la velocidad a la cual los nutrientes presentes en el sustrato son metabolizados, así como también es mayor la velocidad a la cual los subproductos son acumulados en el medio fermentado.

Además, no se observó la 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 h, debido al acondicionamiento previo del inóculo.

Densidad relativa

En la figura 3 observa que la densidad relativa inicial 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 $0,039 \pm 0,003$ g/mL.

Figura 3. Densidad relativa del medio fermentado



Dicha pérdida de masa por unidad de volumen fue provocada por el metabolismo de los microorganismos, al transformar los nutrientes contenidos en el 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 tибicos.

Por otro lado, el medio inoculado en proporción de 0,015 g/mL no reflejó un valor constante de la densidad relativa respecto al tiempo de fermentación dentro de las 72 h del proceso, mientras que el medio inoculado en proporción de 0,030 g/mL se presentó un valor constante a partir de las 60 h, y el medio inoculado en proporción de 0,060 g/mL presentó dicho valor a partir de las 48 h.

Estos períodos indican la finalización del proceso de fermentación, asumiendo que los principales nutrientes en el sustrato habían sido consumidos en su totalidad, coincidiendo con las etapas de declinación observadas en las curvas de la concentración de la biomasa seca.

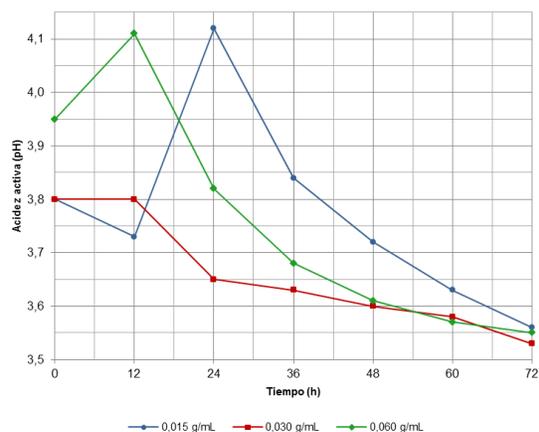
Además, pudo observarse que la tasa de disminución de la densidad relativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña, respecto al tiempo de fermentación, fue directamente proporcional a la cantidad de inóculo.

Tal proporcionalidad indica que mientras mayor sea la cantidad de microorganismos inoculados, más rápido es el consumo de los nutrientes del medio.

Acidez activa

Como se puede observar en la figura 4, la acidez activa 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 $3,50 \pm 0,02$.

Figura 4. Acidez activa del medio fermentado



No obstante, las curvas de la acidez activa en función del tiempo de fermentación no mostraron una evolución similar durante las primeras 24 h, en donde el medio inoculado en proporción de 0,015 y 0,060 g/mL, exhibió un incremento en el valor del pH hasta un valor de $4,06 \pm 0,01$, alcanzando dicho valor a las 24 y a las 12 h, respectivamente.

Por otro lado, el medio inoculado en proporción de 0,030 g/mL no exhibió un descenso pH respecto al tiempo de fermentación, sino que a las 12 h mantuvo la misma acidez 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 g/mL haya incrementado también el pH dentro de las primeras 24 h de fermentación.

La principal influencia en la respuesta del pH 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

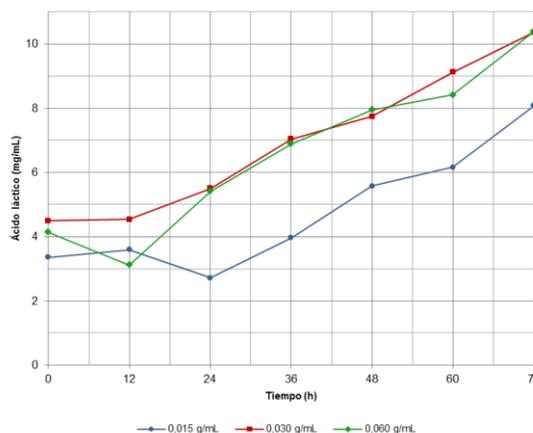
en exceso. No obstante, cuando dicha fuente de carbono se vuelve limitada, los ácidos orgánicos también pueden ser consumidos.

Además, el incremento en el valor 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. ⁽¹⁾

Acidez total titulable

La figura 5 muestra la acidez total titulable, cuyas curvas no exhibieron un comportamiento similar durante las primeras 24 h del proceso de fermentación, en donde se vio reflejado el incremento del valor del pH en el descenso del valor de la acidez total titulable de los medios inoculados en proporciones de 0,015 y 0,060 g/mL, a las 24 y 12 h de fermentación, respectivamente.

Figura 5. Acidez total titulable del medio fermentado



Por otro lado, las curvas de la acidez total titulable manifestaron una evolución similar en el intervalo de las 24 a las 72 h, en donde los medios inoculados en proporciones de 0,030 y 0,060 g/mL, no mostraron una diferencia significativa en el valor de la acidez total titulable, alcanzando ambos un valor final equivalente a $10,37 \pm 0,01$ mg/mL de ácido láctico; mientras que el medio inoculado en proporción de 0,015 g/mL alcanzó un valor final equivalente a $8,08$ mg/mL de ácido láctico.

Se debe considerar que el medio fermentado contiene ácido carbónico, además de los ácidos orgánicos generados por los microorganismos, debido a la solubilización en el medio acuoso del CO_2 que es generado por las bacterias heterolácticas a través de la ruta de la fosfoctolasa y por las levaduras.

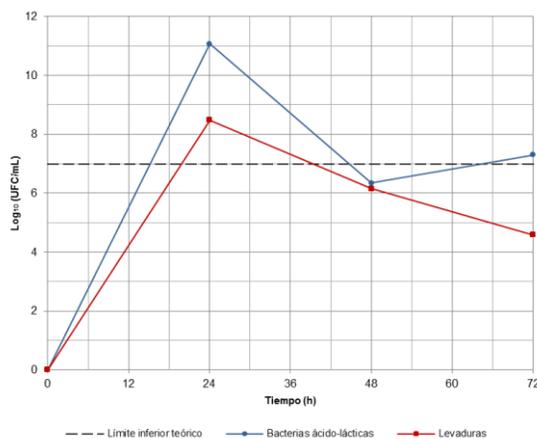
Este parámetro fue el único que no fue cuantificado en duplicado, debido a que la curva de titulación fue afectada por la actividad microbiológica durante el período demorado al realizar la primera titulación, resultando en un valor incorrecto.

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

Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras

La figura 6 muestra el recuento total de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,015 g/mL.

Figura 6. Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado e inoculado en proporción de 0,015 g/mL



En este diagrama se puede observar que dichos microorganismos no conservaron, durante el proceso de fermentación, una concentración estable superior al límite inferior teórico de 10^7 UFC/mL⁽²⁾, necesario para considerar al jugo fermentado como posible alimento probiótico, en donde las bacterias ácido-lácticas superaron este límite a las 24 y 72 h, mientras que las levaduras lo superaron únicamente a las 24 h.

Por otro lado, las poblaciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables mostraron un descenso considerable a partir del máximo valor alcanzado a las 24 h de fermentación.

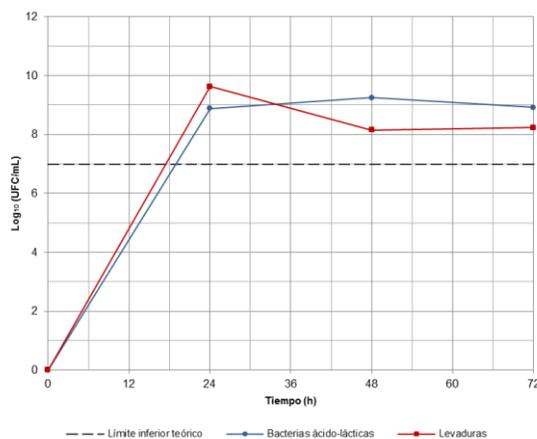
Este comportamiento es inverso al exhibido en el modelo de desarrollo microbiológico de la concentración de la biomasa seca en función del tiempo de fermentación del medio inoculado en proporción de 0,015 g/mL.

La figura 7 muestra el recuento total de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,030 g/mL.

En este diagrama se puede observar que las poblaciones viables de ambos grupos de microorganismos conservaron, en el intervalo de las 24 a las 72 h de fermentación, una concentración estable superior al límite inferior teórico de 10^7 UFC/mL.

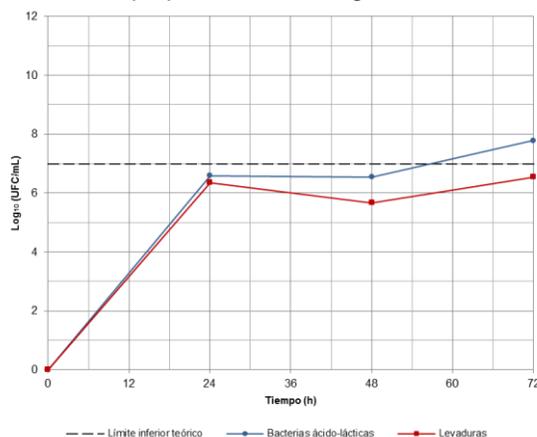
El comportamiento relativamente constante de las poblaciones viables de bacterias ácido-lácticas y de levaduras suspendidas en el medio inoculado en proporción de 0,030 g/mL, indica una adecuada relación el inóculo y la concentración de sustrato fermentable en el jugo del corazón de la piña.

Figura 7. Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado e inoculado en proporción de 0,030 g/mL



La figura 8 muestra el recuento de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio inoculado en proporción de 0,060 g/mL.

Figura 8. Poblaciones totales de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables en el medio fermentado e inoculado en proporción de 0,060 g/mL



En este diagrama se puede observar que las poblaciones de dichos microorganismos no conservaron, durante el proceso de fermentación, una concentración estable superior al límite inferior teórico de 10^7 UFC/mL, en donde únicamente las bacterias ácido-lácticas superaron este límite a las 72 h.

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.

Dicho comportamiento es inverso al exhibido en el modelo de desarrollo microbiológico de la concentración de la biomasa seca en función del

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

tiempo de fermentación del medio inoculado en proporción de 0,060 g/mL.

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 proviene principalmente del metabolismo de estos microorganismos.

Asimismo, al comparar ambas 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 tibicos, mantiene una mayor concentración de bacterias ácido-lácticas respecto a las levaduras.

Por otro lado, estadísticamente se determinó que las variaciones en los valores de todos los parámetros evaluados, respecto a la proporción de inóculo y al tiempo de fermentación, son significativas dentro de un intervalo del 95% de confianza, es decir que las diferencias en los valores son tan grandes que no se pueden ser asociadas a variaciones aleatorias.

CONCLUSIONES

1. Fue posible evaluar a nivel de laboratorio la capacidad de fermentación de los granos de tibicos utilizando el jugo del eje de la inflorescencia de la piña como sustrato único, para su aprovechamiento como posible bebida probiótica, bajo el diseño experimental planteado.
2. La cantidad de agua retenida en los granos de tibicos 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, en donde su amplitud reflejó una relación inversamente proporcional a la cantidad de inóculo.
5. 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 $0,039 \pm 0,003$ g/mL.
6. 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.
7. Los períodos en los cuales la densidad relativa del 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.

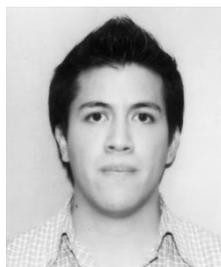
8. La acidez activa inicial del jugo del eje de la inflorescencia de la piña tuvo un valor de $3,80 \pm 0,08$, alcanzando al final de los procesos de fermentación un pH de $3,5 \pm 0,02$.
9. El jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado en proporciones de 0,015 y 0,060 g/mL, exhibió un incremento en el valor del pH y un descenso en el valor de la acidez total titulable, a las 24 y 12 h de fermentación, respectivamente, como resultado de procesos proteolíticos según la literatura.
10. 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 h, 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 g/mL.
11. El jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado en proporción de 0,030 g/mL se considera como posible bebida probiótica en el intervalo de las 24 a las 72 h de fermentación, en base a las concentraciones de bacterias ácido-lácticas y de levaduras viables.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la capacidad fermentativa del jugo del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con granos de tibicos en proporción de 0,030 g/mL, bajo diferentes condiciones experimentales, para obtener una bebida potencialmente probiótica con base en el valor mínimo de UFC/mL.
2. Evaluar la capacidad fermentativa, así como las propiedades organolépticas, del jugo diluido del eje de la inflorescencia de la piña inoculado con granos de tibicos, para obtener una bebida potencialmente probiótica con base en el valor mínimo del UFC/mL.
3. Evaluar la capacidad fermentativa de los granos de tibicos mediante el uso de otros sustratos provenientes de los subproductos generados en la industria alimenticia.
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 así el contenido de microorganismos probióticos y su grado de contaminación.
5. Evaluar la purificación y conservación de los granos de tibicos para su comercialización.
6. Evaluar la capacidad fermentativa 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. GULITZ, Anna; et al. "The microbial diversity of water kefir". *International Journal of Food Microbiology*, vol. 151, num. 3, 2011. p. 284-288.
2. *Handbook of fermented functional foods*. FARNWORTH, Edward R. (ed.). 2a ed. USA: Taylor & Francis Group, 2008. 581 p.
3. *Handbook of probiotics and prebiotics*. LEE, Yuan Kun; SALMINEN, Seppo (eds.). 2a ed. USA: John Wiley & Sons, 2009. 596 p.
4. MIGUEL, Maria Gabriela da C. P.; et al. "Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) 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>>.
5. 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.
6. *Practical fermentation technology*. MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M. (eds.). England: John Wiley & Sons, 2008. 402 p.
7. RUBIO, M. Teresa; et al. "Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos". *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>>.
8. SCHNEEDORF, José Mauricio. "Kefir d'aqua and its probiotic properties". En: *Probiotic in animals*. RIGOBELLO, Everlon Cid. Croatia: InTech. 2012. 272 p.
9. 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/>>.



Jaime Ernesto
Catalán Garrido
Investigador
Ingeniero Químico
Universidad de San
Carlos de Guatemala



César Alfonso
García Guerra
Asesor
Ingeniero Químico
Universidad de San
Carlos de Guatemala