1. Título:

CAPACIDADES FERMENTATIVAS Y GENERACIÓN DE VOLÁTILES DE CEPAS DE LEVADURA AISLADAS EN DIFERENTES ESTADOS PRODUCTORES DE MEZCAL.

Presenta:
I.Q. Elba Montserrat Alcázar Valle

Tutor Académico: Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis.

Asesor: MC. Melchor Arellano Plaza.

2. Agradecimientos.

Por ahí escuche decir que “la gratitud es la flor más exótica en el jardín de la vida.” Efectivamente dar las gracias es algo muy complicado porque es una palabra tan sencilla y tan simple que a veces no creemos que exprese por completo nuestros sentimientos.

Hoy traté de buscar las palabras adecuadas y correctas para agradecer a todas las personas que hicieron posible que terminara satisfactoriamente esta etapa de mi vida.

A mis papás, a mi hermano, a mis tías, por todo su apoyo, cariño y comprensión.

A la Dra Anne Gschaedler, al MC Melchor Arellano, y a mis maestros por sus consejos, enseñanzas, por compartir conmigo sus experiencias.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por todo su apoyo, cariño, comprensión, por sus consejos y su confianza.

A CONACYT por la beca recibida.

No es sencillo expresar lo agradecida que estoy con cada uno de ellos, por lo que solo les puedo decir que no estaría aquí sino no fuera por ellos y lo que lo único que les puedo decir es:

Gracias totales…

3. Resumen.

El mezcal es una bebida que se produce principalmente en los estados de Oaxaca, San Luis Potosí, Durango, Zacatecas y Guerrero. Dependiendo de la región donde se elabore se emplean diferentes especies de *Agave* como materia prima, teniendo que algunas de estas especies son el *Agave angustifolia, Agave cupreata, Agave durangensis, Agave salmiana* y *Agave tequilana.*

Además de la variabilidad en la materia prima, la fermentación se realiza con una gran diversidad de microorganismos que de forma global serán los responsables de la producción de etanol y otros compuestos volátiles.

La variación de la materia prima y la falta de control en el proceso de fermentación, originan que las capacidades fermentativas y la generación de volátiles sean diferentes de una región a otra.

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar las capacidades fermentativas y la generación de volátiles de ocho cepas de levadura mezcaleras, cinco *no-Saccharomyces* y tres *Saccharomyces*, en cinco diferentes jugos de agave (*A. angustifolia, A. cupreata, A. durangensis, A. salmiana* y *A. tequilana*). Obteniendo como resultado que las levaduras del género *no-Saccharomyces* producen altas concentraciones de etanol en los cinco jugos. Además de que no necesariamente la cepa nativa de la región donde fue aislada se adapta mejor al jugo endémico de esta región. También se observó que la generación de compuestos volátiles es influenciada por la especie de agave y la cepa de levadura.

4. Índice de Contenido.

	Página
5. Índice de Cuadros, Gráficas y Figuras	8
6. Antecedentes	11
7. Definición del tema (hipótesis)	12
8. Justificación	13
9. Objetivos	14
9.1. Objetivo General	14
9.2. Objetivos Específicos	14
10. Fundamentación	15
10.1. Proceso de producción de mezcal	16
10.2. Especies de *Agave*	17
10.3. Composición del *Agave*	19
10.3.1. Carbohidratos	19
10.3.2. Nitrógeno	20
10.3.3. Terpenos	21
10.3.4. Saponinas	21
10.3.5. Metales y Minerales	23
10.4 Cocimiento	23
10.5. Fermentación	23
10.5.1. Fermentación alcohólica y respiración	24
10.5.2. Levaduras: Fermentación alcohólica	25
10.5.2.1. Factores de crecimiento y/o fermentación de la levadura	27
10.5.2.2. Inhibidores de crecimiento y/o fermentación de la levadura	28
10.5.2.3. Capacidades fermentativas en las levaduras	28
10.5.3. Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas fermentadas	29
10.5.3.1. Alcoholes superiores	29
10.5.3.2. Esteres	31
10.5.3.3. Carbonilos (acetaldehído)	31
10.5.3.4. Metanol	32

Página

10.5.3.5. Terpenos 32
10.5.3.6. Furfurales 33
10.6. Destilación 33
11. Metodología 34
11.1. Muestreo de agave crudo 34
11.2. Composición química del jugo de *Agave* cocido 35
11.2.1. Nitrógeno 35
11.2.2. Terpenos 36
11.2.3. Saponinas 37
11.3. Selección de cepas 38
11.3.1. Conservación de las levaduras aisladas 38
11.4. Cinética de crecimiento en medio sólido y líquido 38
11.5. Capacidades fermentativas 38
11.5.1. Determinación de la población 39
11.5.2. Azúcares 40
11.5.3. Etanol y compuestos volátiles 41
12. Resultados y discusión 43
12.1. Composición química del jugo de agave cocido 43
12.1.1. Azúcares reductores directos 43
12.1.2. Nitrógeno 44
12.1.3. Terpenos 46
12.1.4. Saponinas 48
12.2. Crecimiento en medio sólido y cinética de crecimiento en medio líquido 49
12.3. Capacidades fermentativas 51
12.3.1. Población celular 52
12.3.2. Azúcares 53
12.3.3. Etanol 54
12.3.4. Parámetros cinéticos 56
12.3.4.1. Parámetros cinéticos en jugo de *A. angustifolia* 56

Página

12.3.4.2. Parámetros cinéticos en jugo de *A. cupreata* 57
12.3.4.3. Parámetros cinéticos en jugo de *A. durangensis* 58
12.3.4.4. Parámetros cinéticos en jugo de *A. salmiana* 59
12.3.4.5. Parámetros cinéticos en jugo de *A. tequilana* 60
12.4. Compuestos volátiles 61
12.4.1. Alcoholes superiores 61
12.4.1.1. Producción de 1-propanol 61
12.4.1.2. Producción de isobutanol 63
12.4.1.3. Producción de alcoholes amílicos 64
12.4.2. Esteres 66
12.4.3. Carbonilos (acetaldehído) 67
12.4.4. Metanol 68
12.4.5. Terpenos 70
12.4.5.1. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. angustifolia* 70
12.4.5.2. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. cupreata* 71
12.4.5.3. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. durangensis* 72
12.4.5.4. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. salmiana* 73
12.4.5.5. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. tequilana* 73
13. Conclusiones 75
14. Recomendaciones 76
15. Referencias 77
16. Anexos 82
Anexo 1. Fermentación y respiración de la levadura 82
Anexo 2. Biosíntesis de otros subproductos 83

Página

Anexo 3. Cinética de fermentación: producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol 84
Anexo 4. Cinética de fermentación: generación de volátiles 89
Anexo 5. Cinética de fermentación: análisis de varianza 99

5. Índice para cuadros, gráficas y figuras.

Página

Cuadros

10.2.1. Algunas especies de *Agave* que se utilizan como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas regionales 18
10.5.1. Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos de los microorganismos que las realizan 24
10.5.2.1. Levaduras aisladas de diferentes estados productores de mezcal 27
10.5.3.1.1. Biosíntesis de alcoholes superiores 30
11.5.3.1. Modelos matemáticos 42
12.1.3.1. Composición de monoterpenos en los jugos de agave cocido 47
12.2.1. Cinética de crecimiento en medio sólido 50
12.2.2. Velocidades máximas de crecimiento específicas de las levaduras mezcaleras 51
12.3.4.1. Parámetros cinéticos de las cepas “mezcaleras” en jugo de *Agave angustifolia* 57
12.3.4.2. Parámetros cinéticos de las cepas “mezcaleras” en jugo de *Agave cupreata* 58
12.3.4.3. Parámetros cinéticos de las cepas “mezcaleras” en jugo de *Agave durangensis* 59
12.3.4.4. Parámetros cinéticos de las cepas “mezcaleras” en jugo de *Agave salmiana* 60
12.3.4.5. Parámetros cinéticos de las cepas “mezcaleras” en jugo de *Agave tequilana* 60
12.4.5.1. Concentración de terpenos en jugo de *A. angustifolia* cocido y fermentado 71
12.4.5.2. Concentración de terpenos en jugo de *A. cupreata* cocido y fermentado 72
12.4.5.3. Concentración de terpenos en jugo de *A. durangensis* cocido y fermentado 72

Página

12.4.5.4. Concentración de terpenos en jugo de *A. salmiana* cocido y fermentado 73

12.4.5.5. Concentración de terpenos en jugo de *A. tequilana* cocido y fermentado 74

Gráficas

12.1.1.1. Concentración total de azúcares reductores en los diferentes jugos de agave cocido 43

12.1.2.1. Concentración de nitrógeno orgánico en los diferentes jugos de agave cocido 44

12.1.2.2. Concentración de nitrógeno amoniacal en los diferentes jugos de agave cocido 44

12.1.3.1. Proporción de monoterpenos en jugo cocido de **a.** *A. angustifolia,* **b.** *A. cupreata,* **c.** *A. durangensis,* **d.** *A. salmiana,* **e.** *A. tequilana* 47

12.1.4.1. Concentración total de las saponinas esteroidales presentes en los diferentes jugos de agave cocido 49

12.2.1. Cinética de crecimiento en medio líquido (YPD) 51

12.3.1.1. Concentración de la población celular en los jugos de **a.** *A. angustifolia, A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72 horas) 52

12.3.2.1. Concentración de azúcares residuales en los jugos de **a.** *A. angustifolia, A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72 horas) 54

12.3.3.1. Producción de etanol en los jugos de **a.** *A. angustifolia, A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72 horas) 55

12.4.1.1. Concentración de 1-propanol (72 horas) 62

12.4.1.2 Concentración de isobutanol (72 horas) 63

12.4.1.3. Concentración de alcoholes amílicos (72 horas) 64

Página

12.4.2.1. Concentración de acetato de etilo (72 horas) 66
12.4.3.1. Concentración de acetaldehído (72 horas) 68
12.4.4.1. Concentración de metanol (72 horas) 69

Figuras

10.3.1.1. Propuesta de estructura de fructano presente en *A. tequilana* Weber var. azul 20
10.3.3.1. Estructura de algunos terpenos presentes en *Agave angustifolia*, *A. tequilana* y *A. salmiana*: (1) limoneno, (2) linalool, (3) 4-terpineol, (4) α-terpineol, (5) nerol, (6) geraniol, (7) citroneol 21
10.3.4.1. Saponinas esteroidales en *A. decipiens* 22
10.5.2.1. Crecimiento celular 25
10.5.3.5.1 Esquema de las reacciones catalizadas por *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *K. lactis* para la biotransformación de monoterpenos 32
11.1. Diagrama global de la metodología 34
11.2.1.1. Diagrama de flujo para la cuantificación de nitrógeno orgánico 35
11.2.1.2. Diagrama de flujo para la cuantificación de nitrógeno amoniacal 36
11.2.3.1. Diagrama de flujo para la cuantificación de saponinas esteroidales 37
11.5.2.1. Determinación de azúcares reductores directos (cuantificación DNS) 40

6. Antecedentes.

Las bebidas alcohólicas que se producen a partir del agave como materia prima se elaboran desde tiempos ancestrales. Sin embargo, comenzaron a tener un gran auge desde la denominación de origen del tequila. A partir de su denominación surgieron una serie de investigaciones para mejorar las condiciones de elaboración de esta bebida, y así generar un producto que se posicionara y se mantuviera en el mercado. Al observar como el tequila obtenía un lugar cada vez más importante en el mercado mundial, se comenzó a buscar el reconocimiento de las demás bebidas alcohólicas elaboradas con agave, siendo una de ellas el mezcal. No obstante, a diferencia del tequila el mezcal se elabora utilizando diferentes especies de agave como materia prima. Además el proceso de fermentación se realiza de forma espontanea ocasionando una gran variabilidad en el sabor y aroma del mezcal. En la actualidad son escasos los estudios que existen sobre la producción de mezcal, por lo que considere importante unirme al grupo de trabajo de la Dra. Anne Gschaedler para participar en el proyecto titulado “Diversidad y actividad de las comunidades microbianas asociadas al proceso fermentativo de mezcal” (SEP-CONACYT 24556), con la asesoría del MC. Melchor Arellano Plaza. Este proyecto fue desarrollado en las instalaciones de CIATEJ.

7. Definición del tema (hipótesis).

La especie de levadura así como la especie de *Agave* influyen sobre las capacidades fermentativas y la generación de volátiles durante la etapa fermentativa en el proceso de producción de mezcal.

8. Justificación.

En el mezcal son escasos y dispersos los estudios de su proceso de producción. Dependiendo del estado donde se elabore, el mezcal puede ser producido utilizando diferentes especies de *Agave*. La variación de la materia prima aunado al hecho de que existen distintas especies de levaduras presentes en la etapa fermentativa, ocasionan que tanto las capacidades fermentativas y la generación de volátiles varíen.

9. Objetivos

9.1. Objetivo General

Evaluar las capacidades fermentativas y generación de volátiles de ocho cepas de levaduras nativas aisladas en procesos de fermentación de diferentes estados productores de mezcal.

9.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el jugo cocido obtenido de cinco especies de agave de forma individual (*A. angustifolia, A. cupreata, A. durangensis, A. salmiana, A. tequilana*), utilizados en la producción de mezcal.

- Evaluar las capacidades fermentativas de las levaduras “mezcaleras” sobre los diferentes jugos de agave.

- Determinar la generación de los principales compuestos volátiles durante la fermentación por las levaduras “mezcaleras” en los diferentes jugos de agave.

10. Fundamentación

La antigua costumbre de "tatemar" agaves (cocer), para obtener alimentos dulces, se convirtió junto con la introducción de la destilación, en una nueva agroindustria. Las bebidas de agave se expresan en las más diversas versiones de sabores y aromas: dulces, ahumados, afrutados, herbáceos, blancos, reposados y hasta añejos (Valenzuela. 2007).

Entre las bebidas alcohólicas destiladas que se obtienen al utilizar el agave como materia prima están: el tequila, el sotol, el bacanora, la raicilla y el mezcal.

La producción de mezcal en México es una actividad principalmente de los estados de Oaxaca, Durango, Zacatecas, Guerreo y San Luis Potosí, a petición de estos estados, el Instituto de la Propiedad Industrial gestionó ante la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, la Denominación de Origen para el mezcal, con el objetivo de establecer una manera de asegurar la calidad por su origen y la tradición de su proceso (Valenzuela. 2007).

Además de contar con la denominación de origen, el mezcal cuenta con una Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-1994), la cual establece que esta bebida puede ser elaborada a partir de los azúcares provenientes de las siguientes especies de agave: *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperrima jacobi*, *Agave weberi cela*, *Agave potatorum zucc*, *Agave salmiana Otto* y otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para la elaboración de otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado (SCFI 1997).

En el 2008 de acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), se realizaron exportaciones de mezcal en 27 países de tres continentes, siendo Estados Unidos y Japón los países más interesados en el consumo de esta bebida, generando ingresos de 21 millones de dólares para esta industria (SAGARPA 2009).

De acuerdo a la SAGARPA, en el 2008 la producción nacional de mezcal certificado fue superior a los dos millones de litros, de los cuales 433,000 se destinaron a la exportación, siendo el estado de Oaxaca el principal productor de mezcal (SAGARPA 2009), ya que más del 50% de mezcal a nivel nacional proviene de esta entidad (SE 2010). Durante el 2009, sólo en el estado de

Oaxaca se tuvo un volumen de producción de 975,000 litros de mezcal certificado, de los cuales se exportaron alrededor de 300,000 litros, principalmente a Estados Unidos, Australia y la Unión Europea (SE 2010).

10.1. Proceso de producción de mezcal (SCFI 1997)

La elaboración de mezcal se inicia en la etapa de recolección del agave, en la mayoría de los casos el agave se recolecta en su forma silvestre por lo que los costos varían según la localización de la planta madura.

Posteriormente las hojas del agave son cortadas (a este proceso se le conoce como jima) para obtener la "piña". Después la piña es llevada a hornos para su cocimiento, en esta etapa los azúcares que se encuentran en esta son hidrolizados a azúcares más simples.

Una vez cocidas las piñas se inicia el proceso de molienda en donde es extraído el jugo de agave conocido como "mosto fresco", que es colocado en tinas construidas de diferentes materiales desde madera de ayacahuite o pino hasta pieles curtidas e incluso cemento para su fermentación. En la fermentación los azúcares presentes son convertidos a etanol y otros compuestos en menor concentración (compuestos volátiles) por acción de las levaduras.

La norma oficial mexicana (NOM-070-SCFI-1994) establece que para la producción del mezcal, la fermentación se puede llevar a cabo por levaduras cultivadas o no (SCFI 1997), por lo que en la actualidad la fermentación del mezcal se realiza de forma espontánea, provocando que exista una gran diversidad biológica de microorganismos realizando la fermentación, aunado al hecho de que el mezcal se puede producir con diferentes especies de agave, y que las zonas geográficas que cuentan con la Denominación de Origen para el mezcal están dispersas en el territorio nacional, generan factores de variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región.

Por lo tanto podemos concluir que el proceso de fermentación varía de un estado a otro, debido a que existen diferentes especies de levaduras que se encuentran presentes en el proceso de fermentación, afectando de forma significativa la conversión de azúcares a etanol, además de la variabilidad de los compuestos volátiles presentes (Molina. 2007).

Terminada la fermentación, el mosto es destilado dos veces y dependiendo del tipo de mezcal deseado, puede ser envasado directamente del destilado y ser vendido como mezcal blanco o bien el destilado puede reposarse en barricas para iniciar el proceso de maduración.

Por lo tanto, la calidad y composición del producto final es una combinación de diferentes factores como la especie y madurez del agave, el cocimiento, la fermentación, la destilación, entre otras.

10.2. Especies de *Agave*

El agave pertenece a la familia de las agaváceas. Son plantas con hojas en arreglo espiral formando una roseta. Su metabolismo es el del ácido crasuláceo (CAM), es decir, que la absorción del dióxido de carbono (CO_2) se lleva a cabo durante la noche anterior y su economía del agua es elevada (De la Barrera. 2007). Forman parte de la biodiversidad de la zona ecológica más extensa en México: la árida y la semiárida que abarca 45.3% del territorio nacional (Valenzuela. 2007).

La familia de las agaváceas incluye 20 géneros y 300 especies de agave, de estas cerca de 200 especies se encuentran en México(Peña. 2004). Siendo el estado de Oaxaca el que cuenta con un mayor número de especies (SAGARPA 2004). Varias de estas especies son importantes desde el punto de vista económico ya que son la materia prima para la producción de bebidas alcohólicas regionales, como el tequila, el sotol, el bacanora, el pulque y mezcal (cuadro 10.2.1.) (Vázquez. 2007).

Los agaves pasan por varias etapas de crecimiento, hasta su maduración, manifestada por el inicio del proceso de floración, con la presencia del calehual o quiote. Éste es cortado alcanzando la madurez en el resto del último año (SAGARPA 2004)

Una vez que el agave alcanza su madurez éste se emplea en la elaboración de bebidas alcohólicas.

Actualmente, para la producción de mezcal se utiliza principalmente agave "silvestre", el tratamiento técnico agrícola es mínimo, previendo sólo algunos cuidados para protección y manejo del agave (López. 2001).

Cuadro 10.2.1. Algunas especies de *Agave* que se utilizan como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas regionales (Vázquez. 2007).

Especie	Características distintivas	Distribución	Usos	Agave
Agave angustifolia Haw.	Roseta de hojas angostas y rígidas. Pariente silvestre de *A. tequilana*.	En la vertiente Pacífica de Sonora a Chiapas. En el Atlántico de Tamaulipas a Yucatán, y Quintana Roo.	Bebidas (mezcal-Oaxaca, bacanora-Sonora), fibras y alimento	
Agave cupreata	Roseta de 1m de de ancho y 80cm de alto, con hojas verde brillante ampliamente lanceoladas con espinas grandes y curvas de color cobre, su inflorescencia mide hasta 6m con flores amarillas.	Michoacán y Guerrero	Bebida (mezcal)	
Agave durangensis Gentry.	Roseta hasta de 1.8m de diámetro, pencas glauco grisáceas y ásperas en afloramiento.	Durango, Zacatecas.	Bebida ("Tepe", mezcal-Tepehuano, Durango), fibra y alimento.	
Agave salmiana Otto.	Rosetas hasta de 1.2m de alto, compactas o extendidas, pencas anchas con puntas sigmoides, espina larga y brácteas suculentas grandes en el escapo	Jalisco (Lagos de Moreno), San Luis Potosí, Querétaro, Puebla y Oaxaca.	Alimento, bebida y fibra	
Agave tequilana Weber variedad Azul	Difiere de *A. Angustifolia* en sus hojas de color azul	Se desconoce su estado silvestre	Bebida (tequila)	

10.3. Composición del *Agave*

La composición química del agave es compleja. Teniendo que algunos compuestos son los carbohidratos, el nitrógeno (amoniacal y aminoácidos), los terpenos, las saponinas, los metales y minerales.

10.3.1. Carbohidratos (Rendón. 2007)

Los carbohidratos son compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. A partir de la fotosíntesis, las plantas y las bacterias los producen.

Mediante el proceso de fotosíntesis se absorbe el CO_2 del aire, y por acción de la energía solar, se produce glucosa y otros compuestos químicos necesarios para que los organismos sobrevivan y crezcan. No obstante, los agaves al ser plantas CAM dicha absorción de CO_2 la realizan en la noche anterior, lo que provoca un desfase en el tiempo de la fijación de CO_2 para la producción de glucosa que ocurre durante el día.

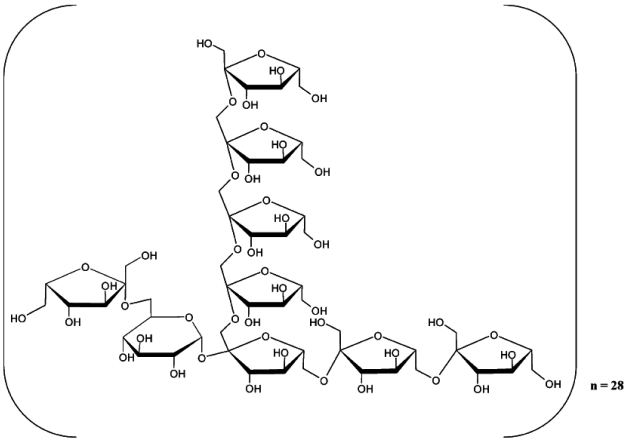
A lo largo de su crecimiento los agaves acumulan en las piñas los carbohidratos no estructurales, que son empleados en los procesos de fermentación, así como carbohidratos estructurales que conforman a las fibras de las hojas (Rendón. 2007).

Los carbohidratos de reserva presentes en las piñas son fructo-oligosacaridos, principalmente fructanos, cuya hidrólisis produce aproximadamente el 90% de fructosa como principal componente.

López y col. en el 2003 realizaron estudios en *Agave tequilana* Weber var. azul (figura 10.3.1.1.) encontrando que existen diferentes tipos de fructanos, que no son inulina, en agaves de ocho años de crecimiento (López. 2003).

En la etapa de cocimiento los fructo-oligosacaridos presentes en la piña son hidrolizados a azúcares más simples como glucosa, fructosa y sacarosa, que posteriormente en la etapa de fermentación la levadura consumirá para producir etanol.

Figura 10.3.1.1. Propuesta de estructura de fructano presente en *A. tequilana* Weber var. azul (López. 2003).



10.3.2. Nitrógeno

Es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas debido a que es un contribuyente de todas las proteínas (aminoácidos). Se absorbe del suelo generalmente bajo las formas de nitritos (NO_3^-) y amonio (NH_4). El contenido de nitrógeno en los suelos varía en un amplio espectro.

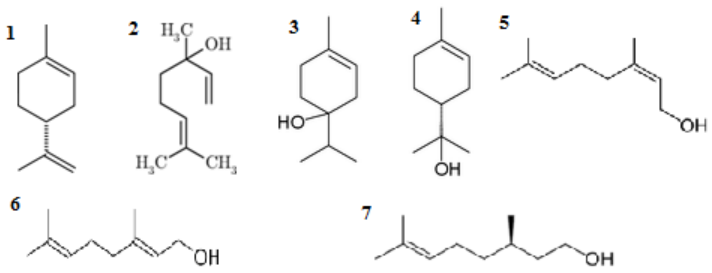
Conocer la cantidad de nitrógeno en planta es importante para fines industriales, debido a que este es un nutriente importante para que la levadura pueda crecer y fermentar. Estudios realizados en vino muestran que la cantidad de nitrógeno orgánico (aminoácidos) presente en la uva, está unido estrechamente al perfil aromático de la bebida (Hernández. 2002).

Estudios realizado con *A. tequilana* de ocho y nueve años de crecimiento reportan una cantidad de nitrógeno asimilable en planta de 0.02 a 0.03% (Sánchez. 1953), por lo que para fines industriales, existe una escases de este nutriente siendo necesario adicionar fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio para activar la fermentación. No obstante es importante saber la concentración de nitrógeno que se debe de adicionar además de su naturaleza ya sea nitrógeno orgánico (mezcla de aminoácidos) o inorgánico (sulfato de amonio) debido a que se ha reportado que la adición de nitrógeno orgánico e inorgánico o una mezcla de ambos genera cambios en la composición de los compuestos volátiles (Arrizon. 2001).

10.3.3. Terpenos

Son un grupo de compuestos lípidicos diversos y numeroso: formado por alrededor de 30,000 compuestos (figura 10.3.3.1). Este estudio se enfoca a los monoterpenos que son compuestos formados por 10 enlaces de carbono, que tienen cualidades sensoriales fuertes. Se encuentran ampliamente en la naturaleza, son producidos por plantas, algas y hongos, su precursor común es el geranil pirofosfato (GPP)(King. 2000). Peña Álvarez y col. en el 2004 identificaron diferentes terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) en tres plantas de agave, obteniendo que existen nueve en *Agave salmiana,* ocho en *Agave angustifolia* y 32 en *Agave tequilana* Weber var. azul (Peña. 2004). Estos compuestos son importantes ya que dan sabores y aromas característicos a las bebidas, por lo cual algunos autores han reportado que la presencia de monoterpenos es el resultado de la hidrólisis de terpenos glicosidados, que se encuentran también en la planta, por acción de la enzima β-glicosidasa, que se encuentra presente en levaduras como la *S. cerevisiae* durante el proceso de fermentación (Molina. 2007).

Figura 10.3.3.1. Estructura de algunos terpenos presentes en *Agave angustifolia, A. tequilana* y *A. salmiana*: (1) limoneno, (2) linalool, (3) 4-terpineol, (4) α-terpineol, (5) nerol, (6) geraniol, (7) citronelol.(Peña. 2004)



10.3.4. Saponinas.

Principalmente localizadas en la hoja del agave, constan de una parte glucídica (con uno o más azúcares), que puede ser glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa, y una parte no glucídica denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica.

Se caracterizan por su capacidad de ser tensoactivos naturales. Tienen un peso molecular elevado y se hidrolizan mediante ácidos o enzimas.

Su aislamiento en estado puro es difícil. Se extraen con alcoholes o soluciones hidroalcohólicas, tras una deslipidación previa.

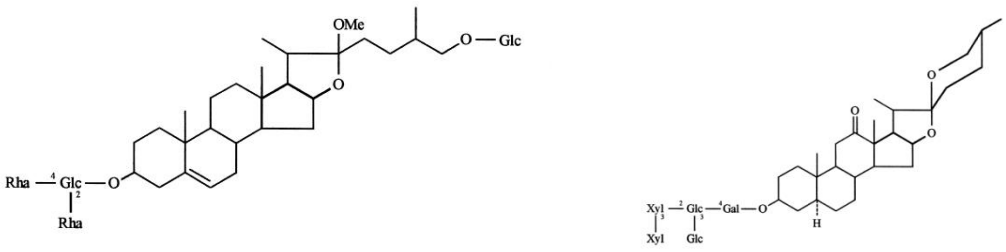
La clasificación se hace según la naturaleza de la sapogenina. Así se distinguen entre saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales, siendo estas últimas las que se encuentran principalmente en el agave (López. 2001). La porción esteroidal de las saponinas se origina por la ruta de la acetil-CoA vía ácido mevalónico y escualeno.

Algunas formas en las que se pueden reconocer fácilmente la presencia de saponinas en soluciones acuosas es por medio de análisis fitoquímicos preliminares mediante ensayos de la espuma, hemólisis de glóbulos rojos, Liebermann-Burchard y ensayos para carbohidratos. Además, algunos métodos analíticos que se utilizan para su cuantificación son gravimetría, espectroscopia, cromatografía de líquidos (HPLC), colorimetría, cromatografía en capa fina (TLC) y resonancia magnética nuclear (RMN), entre otras.

Estudios realizados en *Agave decipiens* muestran la presencia de cuatro saponinas esteroideales (figura 10.3.4.1) (Gaward. 1999), mientras que en *Agave utahensis* se aislaron 15 saponinas esteroideales (Yokosuka. 2009), por lo que la concentración de saponinas varia de una especie a otra.

La concentración de saponinas en el jugo de agave es importante debido a que altas concentraciones pueden ocasionar la inhibición de algunas especies de levadura en la etapa de fermentación.

Figura 10.3.4.1. Saponinas esteroidales en *A. decipiens* (Gaward. 1999)



10.3.5. Minerales y Metales

Los minerales y metales presentes en el agave varían de una especie a otra, debido a las condiciones de suelo en la cual hayan sido plantados. Sin embargo, por datos experimentales se sabe que los principales minerales presentes en el mosto de agave son el calcio, magnesio y fosfatos (Arrizon. 2005).

Estudios realizados en las piñas de *A. salmiana* demostraron la presencia de minerales como el zinc, calcio, magnesio, hierro y cobre (Silos. 2005).

10.4. Cocimiento

En la etapa de cocimiento los azúcares presentes en la piña son hidrolizados con el fin de obtener azúcares más simples para posteriormente ser fermentados. Para la producción de mezcal el cocimiento se realiza a cabo en hornos que pueden ser húmedos cuando se calientan con vapor o secos cuando se calientan con rocas previamente calentadas con leña. Los hornos que se utilizan son rústicos, algunos están recubiertos por ladrillo y en la parte baja hay una tubería por donde se inyecta el vapor.

En esta etapa además de la hidrólisis de los fructanos para la generación de monosacaridos, ocurren las reacciones de Maillard en donde se generan compuestos como el metanol, y los furfurales, también ocurre la generación de los D-aminoácidos, encontrándose principalmente la presencia de D-Alanina en jugo de agave (Pätzold. 2005).

10.5. Fermentación

Muchos productos de la industria alimenticia están basados en la fermentación: vinos, cerveza, pan, quesos, chocolate, entre otros productos son ahora alimentos permanentes en la dieta de toda persona.

En las levaduras (véase sección 10.5.1), se conocen dos mecanismos de conservación de energía: la fermentación y la respiración. Desde el punto de vista de las reacciones redox, la fermentación y la respiración difieren en que la primera el proceso redox ocurre en ausencia de aceptores finales de electrones, mientras que la segunda el oxígeno molecular o algún otro aceptor de electrones funciona como aceptor final de electrones (Bamforth. 2007).

La clasificación de fermentaciones se realiza basándose en los sustratos fermentados o en los productos formados (cuadro 10.5.1)

Cuadro 10.5.1. Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos de los microorganismos que las realizan(Madigan. 2004).

Tipo	Reacción global	Microorganismo
Fermentación alcohólica	$Glucosa \rightarrow 2Etanol + 2CO_2$	Levadura *Zymomonas*
Fermentación homoláctica	$Hexosa \rightarrow 2Lactato^- + 2H^+$	*Streptococcus* Algunos *Lactobacillus*
Fermentación heteroláctica	$Hexosa \rightarrow Lactato^- + Etanol + CO_2 + H^+$	*Leuconostoc* Algunos *Lactobacillus*
Ácido propiónico	$Lactato^- \rightarrow Propionato^- + Etanol + CO_2 + H^+$	*Propionibacterium*

La fermentación alcohólica consiste en la transformación de los azúcares simples como glucosa o fructosa en etanol y otros compuestos que directamente definen las principales características de la bebida alcohólica (Madigan. 2004).

10.5.1. Fermentación alcohólica y respiración

Al inicio del proceso de fermentación, las levaduras comienzan a metabolizar los azúcares y nutrientes presentes (nitrógeno y minerales). Las levaduras usan todos estos nutrientes para obtener energía e incrementar su población.

La fermentación alcohólica ocurre si existe una gran cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo bajo condiciones aeróbicas: más piruvato y NADH son producidos del que las mitocondrias pueden oxidar. Por lo que el exceso de piruvato es convertido a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa y después es reducido a etanol convirtiendo NADH a NAD+ por acción de la alcohol deshidrogenasa (anexo1).

De acuerdo a lo que ocurre en la respiración y fermentación, la formación aeróbica de etanol puede ser el resultado de la competencia entre la piruvato deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa por el sustrato común piruvato que tiene diferentes formas de asimilación. Para

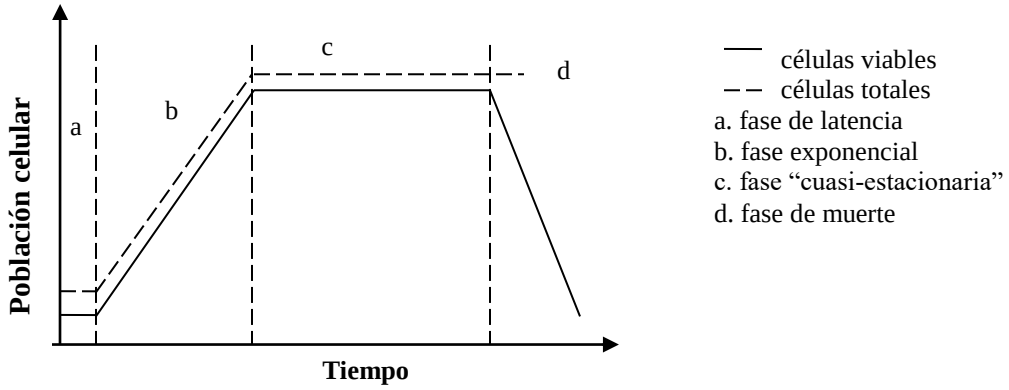
usar glucosa como fuente de energía las células deben mantener su balance NAD+/NADH, y si la fuente energética es etanol se regenera NADPH (Arrizon. 2001).

10.5.2. Levaduras: Fermentación alcohólica

Las levaduras son organismos quimiótrofos debido a que obtienen su energía por oxidación de los compuestos químicos, además son organismos heterótrofos debido a que oxidan moléculas orgánicas de las cuales el tipo más común son los azúcares (Bamforth. 2007). Las levaduras son las responsables de los procesos de fermentación siendo la *Saccharomyces cerevisiae* la especie que se utiliza en la mayoría de las fermentaciones de bebidas alcohólicas para producir etanol, dióxido de carbono y volátiles.

Durante las primeras horas de la fermentación, la población de levaduras no se incrementa. En este periodo, llamado fase de latencia, es necesario para las células adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Una vez que las levaduras se han adaptado a las condiciones ambientales, comienzan a crecer. Esta etapa denominada fase exponencial, es altamente influenciada por la temperatura, la concentración de nitrógeno con grupos amonio, aminoácidos y otros nutrientes, además por la presencia de oxígeno. Después de esta etapa, las levaduras detienen su crecimiento debido a que algunos nutrientes comienzan a ser deficientes. Durante esta nueva etapa llamada fase "cuasi-estacionaria" la población de levaduras gradualmente decrece hasta casi desaparecer. Durante este periodo las levaduras mueren debido a la falta de nutrientes, además del etanol y otras sustancias producidas durante la fermentación que son tóxicas para las levaduras (figura 10.5.2.1.) (Moreno. 2009).

Figura 10.5.2.1. Crecimiento celular



Diferentes especies de levaduras participan en el proceso de fermentación alcohólica. En la producción de vino normalmente los géneros *Kloeckera, Hanseniaspora* y *Candida* predominan en las etapas iniciales de la fermentación. Después *Pichia* y *Metschnikowia* prevalecen en etapas intermedias. Finalmente *Saccharomyces cerevisiae* predomina al final de la fermentación debido a que tiene resistencia a altas concentraciones de etanol. Algunas otras levaduras como *Torulaspora, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* pueden estar presentes durante la etapa de fermentación (Moreno. 2009).

Para la producción del tequila se han identificado 10 géneros de levaduras, estos géneros son *Brettanomyces, Candida, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycodes, Zygosaccharomyces, Torulaspora* e *Issatchenkia* (CIATEJ 2004).

Sin embargo, en lo que se refiere al mezcal existe poca información sobre las levaduras presentes en el proceso fermentativo. Escalante y col. en 2008 realizaron estudios en el proceso de fermentación del mezcal con *A. salmiana* y encontraron once especies de microorganismos, de los cuales identificaron tres levaduras: *C. lusitaniae, P. fermentans* y *K. marxianus* (Escalante. 2008) En este estudio se denotó la ausencia de *S. cerevisiae,* situación que indica que esta especie probablemente no tiene capacidad de crecer y fermentar en jugo de *A. salmiana*. Asimismo, Segura García en 2010 identificó 26 especies de levaduras presentes en el proceso de fermentación de mezcal en el estado de Oaxaca, siendo las cepas mayoritarias *S. cerevisiae, T. delbrueckii, K. marxianus, Z. bisporus* y *Z. rouxii* (Segura. 2010).

Para el presente trabajo, se eligieron ocho cepas nativas que fueron aisladas del proceso de fermentación en los diferentes estados productores del mezcal. El criterio de selección, fue escoger las cepas que son mayoritarias durante el proceso de fermentación. Obteniendo tres cepas *Saccharomyces* y cinco cepas no-*Saccharomyces* (cuadro 10.5.2.1.).

Cuadro 10.5.2.1. Levaduras aisladas de diferentes estados productores de mezcal*.

Jalisco	Durango	Guerrero	Oaxaca	San Luis Potosí	Zacatecas
AR5 *Saccharomyces cerevisiae*	DGOP *Zygosaccharomyces bisporus*	OFF1 *Kluyveromyces marxianus*	DI1 *Torulaspora delbrueckii*	SLP1 *Kluyveromyces marxianus*	ZAC1 *Saccharomyces cerevisiae*
			MC4 *Saccharomyces cerevisiae*	SLPA *Candida ethanolica*	

10.5.2.1. Factores de crecimiento y/o fermentación de la levadura

La producción de células de levadura y la producción de alcohol mediante la levadura difieren en el hecho de que el primero requiere de la presencia de oxígeno para la producción máxima de materia celular, mientras que el segundo es anaerobia (fermentación) (Bamforth. 2007).

Los principales elementos que ayudan a la levadura a su crecimiento son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno. Debido a que estos elementos son los constituyentes elementales de los componentes celulares clave (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucléicos). El fósforo y azufre también son importantes en este aspecto. El calcio, magnesio, potasio, hierro y sodio, entre otros son demandados por la levadura en pequeñas cantidades, debido a que sirven como balance iónico, precursores de aminoácidos y vitaminas o incluso como reguladores de estrés por temperatura y etanol en el caso particular del magnesio (Hérnandez. 2007).

Para contar con un crecimiento adecuado de la levadura es necesario desarrollar inóculos, que mejorarán significativamente los rendimientos, la productividad y el tiempo de fermentación. Sin embargo, aunque se consiga un desarrollo adecuado del inóculo, la levadura debe poseer una alta capacidad de adaptación a las deficiencias nutricionales y a la presencia de inhibidores.

* La cepa AR5 es la única levadura que fue aislada de un estado productor de tequila.

10.5.2.2. Inhibidores de crecimiento y/o fermentación de la levadura

La membrana celular de las levaduras está compuesta de fosfolípidos que le otorgan flexibilidad a la membrana; y de esteroles que aumentan la rigidez de la membrana y disminuyen su permeabilidad, mantienen por más tiempo su actividad fermentativa, y al final de la fermentación se degrada una mayor cantidad de azúcares. No obstante, durante el proceso de fermentación, la levadura produce etanol y al aumentar su concentración en el medio este genera la degradación de los esteroles ocasionando una inhibición por etanol (Tomasso. 2004). Además la interacción levadura-levadura dentro del proceso de fermentación que es conocida como *efecto killer*, implica la secreción por parte de ciertas cepas de levaduras de una proteína tóxica de baja masa molecular, llamada toxina *killer*, mata a células denominadas sensibles, las cuales pueden ser del mismo o diferentes géneros (Nally. 2005).

Estudios realizados en tequila por Lachance en 1995, demostraron la presencia del efecto *killer* en las siguientes levaduras: *S. cerevisiae, P. membranaefaciens, P. anomala, T. delbrueckii* y *P. kluyveri.* En lo que se refiere a la tolerancia al etanol encontró que *S. cerevisiae, S. ludwigii, C. milleri, Z. bailii, T. delbrueckii, K. marxianus, H. vineae, H. guilliermondii* presentan una tolerancia al etanol en un rango del 6 al 12% v/v (Lachance. 1995).

Finalmente, la presencia de saponinas en el jugo de agave también genera una inhibición en el crecimiento de la levadura. Estudios realizados con saponinas esteroidales de *Yucca schidigera* muestran que dependiendo del tipo de saponinas esta inhibirá o no las levaduras, las levaduras que presentan inhibición en su crecimiento con este tipo de saponinas son *S. cerevisiae, C. albicans, H. anomala, P. nakazawae, K. apiculata, D. hansenii* (Miyakoshi. 2000).

10.5.2.3. Capacidades fermentativas en las levaduras

Las capacidades fermentativas de las levaduras en la industria de las bebidas fermentadas, se entiende como el conjunto de parámetros cinéticos durante la producción de alcohol y otros compuestos aromáticos, que serán considerados para establecer los tiempos de fermentación y condiciones de operación para la obtención de las bebidas deseadas a nivel industrial.

Existen varios factores que pueden afectar las capacidades fermentativas de las levaduras como lo son: la temperatura, el pH, la aireación y la composición del mosto de fermentación. Por tanto, es necesario conocer como impactan las condiciones de operación a las levaduras, para asegurar que la calidad de los productos obtenidos se encuentre dentro de estándares establecidos.

Comprender como las levaduras influyen en las propiedades claves como lo son el aroma y el sabor provee la plataforma básica para la selección de cepas que desarrollaran los cultivos iniciales y el manejo de la fermentación alcohólica.

Estudios realizados en vino ponen en evidencia que la adición de especies como *Hanseniaspora, Candida, Pichia, Zygosaccharomyces, Kluyveromyces,* entre otras generan o contribuyen a adicionar complejidad a la producción de vino (Fleet. 2008).

10.5.3. Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas fermentadas

Existen diferentes compuestos que forman parte del aroma y sabor de las bebidas alcohólicas los cuales se pueden dividir principalmente en: alcoholes superiores, esteres, carbonilos, metanol, terpenos, furfurales y misceláneos (ácidos grasos, fenoles, lactonas, compuestos sulfurados).

Estudios realizados en vino demuestran que el empleo de algunas cepas no-*Saccharomyces* como *H. uvarum* y *C. stellata* originan alta producción de esteres y baja producción de alcoholes superiores (Romano P. 2003). Sin embargo, el empleo de cepas no-*Saccharomyces* como la *K. apiculata* genera alta producción de alcoholes superiores y baja producción de esteres (Mateo J.J. 1991).

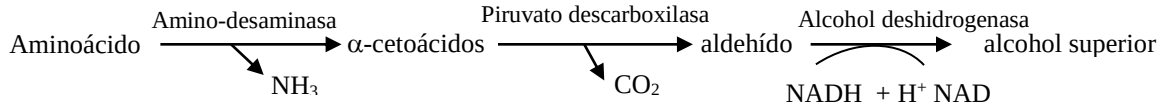
10.5.3.1. Alcoholes superiores

Algunos alcoholes fuertemente aromáticos como el 1-propanol, 2-metil 1-propanol (isobutanol), 1-butanol, 2-metil 1-butanol y 3-metil 1-butanol (alcoholes amílicos), son frecuentemente encontrados en bebidas alcohólicas. Se generan a partir de los aminoácidos que reaccionan para formar cada uno de estos alcoholes, aunque también se pueden formar por un proceso anabólico de azúcares.

La formación de estos alcoholes es estimulada por el aumento de nitrógeno en el medio, de esta forma la mayor parte de aminoácidos presentes puede ser convertida a estos alcoholes (Arrizon. 2001).

La ruta catalítica de biosíntesis de alcoholes superiores es a partir de aminoácidos que por reacciones de desaminación y descarboxiliación se obtiene el aldehído, que será convertido en alcohol superior por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa (cuadro 10.5.3.1.1).

La ruta anabólica de biosíntesis de alcoholes superiores ocurre cuando existe deficiencia de aminoácidos o de nitrógeno en general, lo que disminuye la cantidad de grupos amino, por lo que los α-cetoácidos no se transaminan, sino que se descarboxilan originando aldehídos que después son convertidos a alcoholes superiores (anexo 2) (Arrizon. 2001).



Cuadro 10.5.3.1.1. Biosíntesis de alcoholes superiores (Arrizon. 2001).

Aminoácido	α-Cetoácido	Aldehído	Alcohol superior
Treonina o metionina	α-cetobutirato	Propilaldehido	1-propanol
Valina	α-cetoisovalerato	α-hidroxi-isovaraldehido	Isobutilico
Leucina	α-cetoisocaproato	Isovaraldehido	Isoamilico
Isoleucina	α-ceto-β-metil-valerico	α-hidroxi-isocaprilaldehído	Amílico

10.5.3.2. Esteres

Se caracterizan por otorgar sabores y olores afrutados, además sus umbrales de detección son muy bajos (gran impacto aromático). Su formación se produce en las fases finales de la fermentación, al contrario de los alcoholes que se producen al inicio, su formación es controlada enzimáticamente por la Acyl-coenzima A.

La formación de esteres depende de las condiciones de fermentación y de la levadura utilizada, siendo el más abundante en todas la bebidas alcohólicas el acetato de etilo.

La síntesis del acetato de etilo en *S. cerevisiae* se realiza por medio de la enzima alcohol acetil transferasa, la cual combina una molécula de acetato proveniente del acetil-coA y una molécula de etanol. La cantidad de acetato de etilo puede disminuir por acción de las esterasas, las cuales realizan la hidrólisis de ésteres alifáticos y aromáticos, y también participan en la liberación de ácidos grasos de cadena media a partir de lípidos (anexo 2).

La síntesis de ésteres también está relacionada con la cantidad de aminoácidos, y cuando la concentración de amino-nitrógeno es alta la concentración de ácidos grasos disminuye provocando menos inhibición en la enzima alcohol-acetil-transferasa (Arrizon. 2001)

10.5.3.3. Carbonilos (acetaldehído)

Los cetoácidos son esenciales para la síntesis de los aminoácidos, también en la formación de alcoholes superiores por la levadura. Además los cetoácidos sirven como intermediarios cuando los aldehídos son formados por levaduras.

La falta de nutrientes o cualquier elemento que disminuya la viabilidad y/o la actividad de las levaduras generan un aumento de la concentración de aldehídos, ya que la reacción de fermentación queda incompleta y se detiene a nivel aldehído.

El acetaldehído es el compuesto que más se genera en la fermentación alcohólica, su biosíntesis se lleva a cabo por la enzima piruvato descarboxilasa (anexo 1). Sin embargo, los aldehídos no sólo son generados por biosíntesis, también pueden ser producidos por reacciones de oxidación

reducción durante el añejamiento. En este proceso ocurre una auto-oxidación ya que la presencia de ciertos minerales en las barricas ayuda a catalizar la oxidación de los alcoholes para producir aldehídos.

10.5.3.4. Metanol

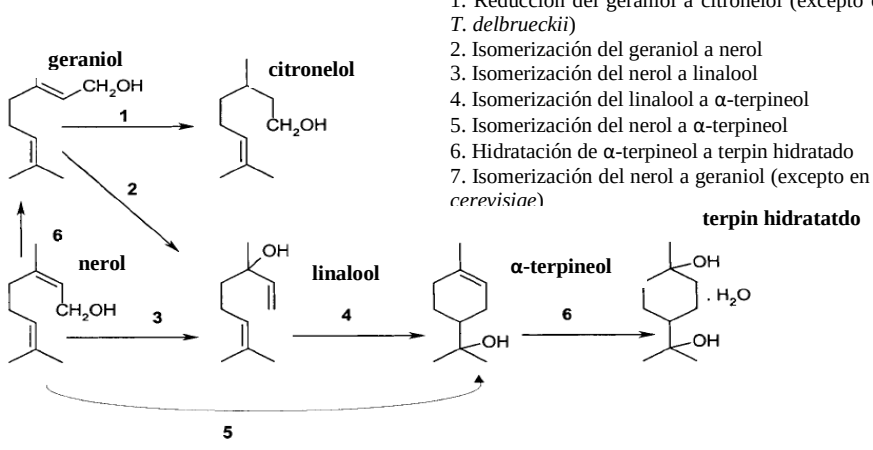
Se origina principalmente en la etapa de cocimiento por la degradación de las pectinas presentes en las piñas de agave. En el caso del tequila es posible que algunas especies de levadura tengan la enzima pectin-metil-esterasa y sean capaces de hidrolizar pectinas y generar metanol, debido a que se ha reportado que diferentes mostos con la misma composición fermentados con diferentes cepas presentaron diferentes concentraciones de metanol (Arrizon. 2001).

10.5.3.5. Terpenos

Como se mencionó en la sección 10.2.4., los terpenos se encuentran presentes en el agave, de forma libre o glicosidada (monoterpenos o sesquiterpenos). Esta última por medio de la enzima β-glicosidasa presente en algunas levaduras, puede hidrolizar estos compuestos liberando a los monoterpenos y de esta forma se crean notas características a la bebida.

Además de esta hidrólisis, se ha reportado que en algunas levaduras como es el caso de las *S. cerevisiae, T. delbrueckii* y *K. lactis* ocurre una biotransformación de un monoterpeno a otro en la etapa de fermentación, para la producción de vinos y cerveza. Ocasionando un cambio en las notas aromáticas de la bebida (figura 10.5.3.5.1) (King. 2000; Takoi. 2010)

Figura 10.5.3.5.1. Esquema de las reacciones catalizadas por *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *K. lactis* para la biotransformación de monoterpenos (King. 2000).



Guerrero y col. en 2007 analizaron los compuestos volátiles presentes en 10 diferentes mezcales comerciales encontrando los siguientes terpenos: α-terpineol, citronelol, linalool, trans-linalool óxido, cis-linalool óxido, farnesol isómero α y nerolidol (Molina. 2007).

De León Rodríguez y col. en 2006 encontraron los siguientes terpenos presentes en mezcales comerciales elaborados a partir de *Agave salmiana:* α-terpineol, α-terpineno y limoneno (De León. 2006).

10.5.3.6. Furfurales

Son compuestos de origen variado, en general provienen del procesamiento térmico de la materia prima utilizada en la elaboración del mezcal, como es el caso del 2-furfuraldehido y el 5-hidroximetil 2-furfuraldehído, que se originan principalmente por la degradación térmica de carbohidratos durante el cocimiento del agave (Molina. 2007).

La mayoría de los mezcales contienen compuestos volátiles similares a los que se presentan en el tequila y otras bebidas alcohólicas. Sin embargo, los mezcales contienen compuestos únicos como el limoneno y el pentil-butanoato, que pueden ser usados como marcadores (De León. 2006).

10.6. Destilación

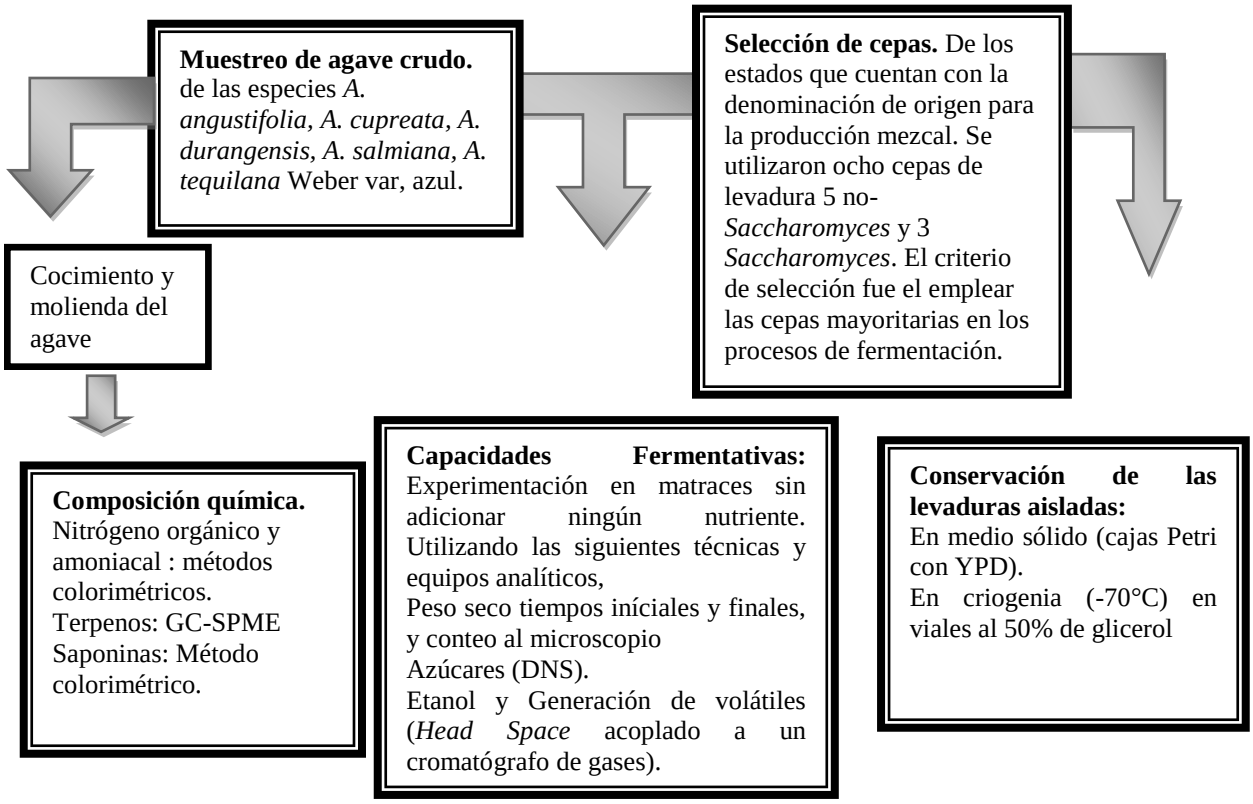
La destilación es utilizada para obtener una bebida de alto grado alcohólico después de la fermentación de los azúcares del agave cocido.

En el mezcal, al igual que el tequila, se realiza una doble destilación. En la primera se obtiene el ordinario, el cual vuelve a ser destilado para obtener el rectificado. A este último se le mide su grado alcohólico, ajustándose con agua para ser envasado y vendido como mezcal blanco (Segura. 2010).

11. Metodología

El diagrama que se muestra en la figura 11.1. muestra un esquema general de la metodología que se emplea en el presente trabajo.

Figura 11.1. Diagrama global de la metodología



11.1. Muestreo de agave crudo

Se obtuvieron piñas crudas de las diferentes especies de agave de las zonas mezcaleras, *A. angustifolia* Haw del estado de Oaxaca, *A. cupreata* de Guerrero, *A. durangensis* de Durango, *A. salmiana* de San Luis Potosí, y además se obtuvo jugo de *A. tequilana* Weber variedad azul de Jalisco.

El cocimiento de las piñas se llevo a cabo en autoclave, a una presión de alimentación de 3 a 4kg/cm^2, manteniéndose la mayoría del tiempo a 3kg/cm^2, la temperatura de cocimiento fue de 92°C, la temperatura de salida de vapor osciló entre los 100 a 150°C, el tiempo de cocimiento

fue de 18 horas aproximadamente. Posteriormente se extrajo y se filtró el jugo de agave de las diferentes especies.

11.2. Composición química del jugo de *Agave* cocido

11.2.1. Nitrógeno (Cheney. 1962)

Se cuantificó el nitrógeno orgánico y amoniacal de los diferentes jugos de agave, las técnicas que se emplearon se muestran en los diagramas de las figuras 11.2.1.1. y 11.2.1.2. respectivamente.

En las pruebas de nitrógeno orgánico, se empleó una solución de L-arginina a 30mM para la curva de calibración, debido a que es el aminoácido que predomina en el jugo de *A. tequilana* (Díaz. 2008), y para el nitrógeno amoniacal se utilizó el sulfato de amonio a 1g/L para hacer la curva de calibración, debido a que este compuesto se utiliza para nutrir los suelos cuando están carentes de nitrógeno. En ambos casos se utilizó el lector de microplacas *Bio-Rad* modelo 680XR, para obtener los valores de absorbancia de las diferentes muestras.

Figura 11.2.1.1. Diagrama de flujo para la cuantificación de nitrógeno orgánico

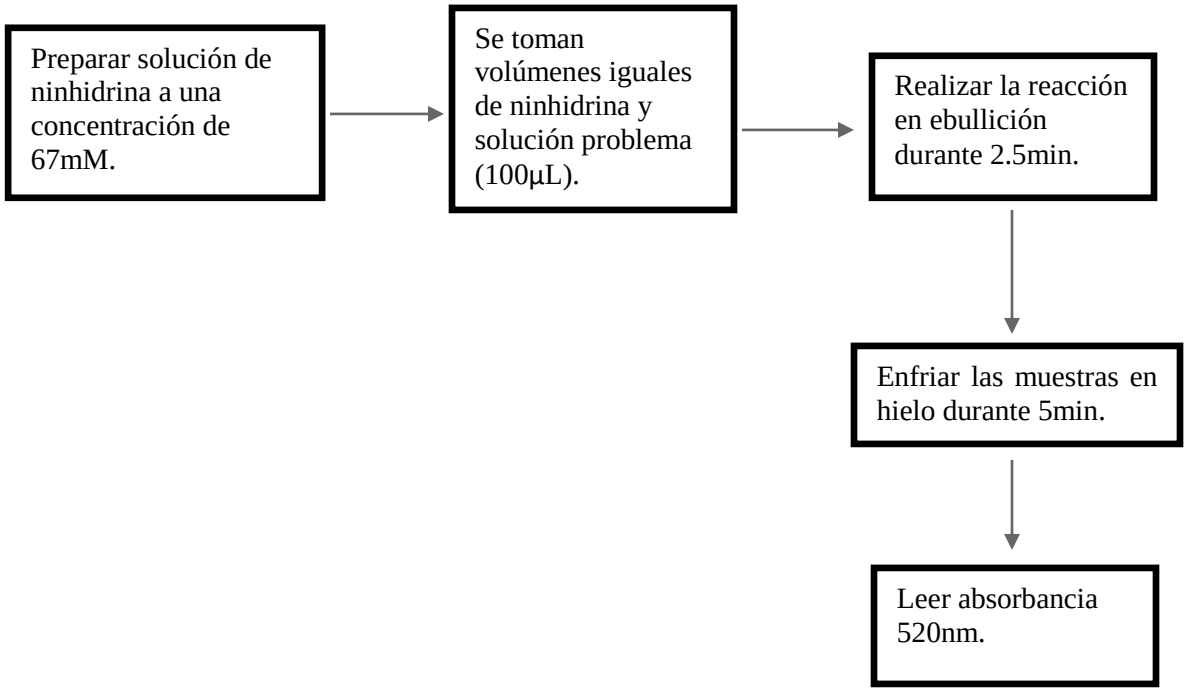
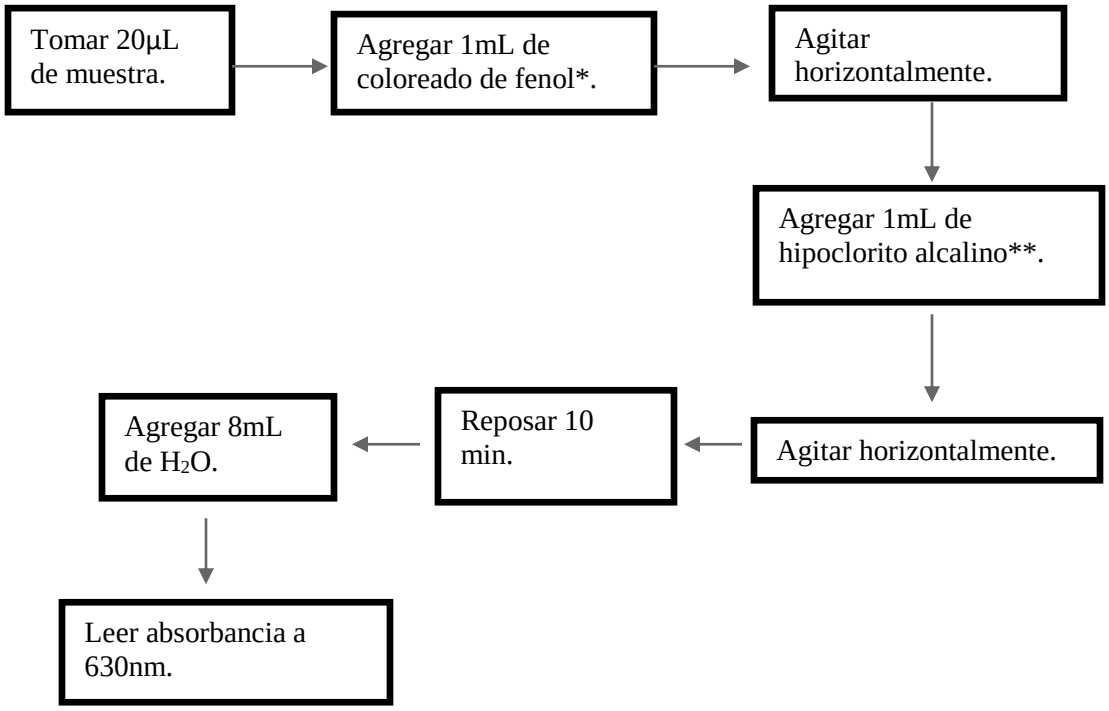


Figura 11.2.1.2. Diagrama de flujo para la cuantificación de nitrógeno amoniacal



*Coloreado de fenol: Disolver 25g de fenol en 400mL de agua destilada. Por separado se disuelven 125mg de nitroferocianuro de sodio en 50mL de agua destilada y se añaden a la solución de fenol se afora a 500mL.

**Solución de hipoclorito alcalino: Disolver 12.5g de NaOH en 400mL de agua destilada, posteriormente se añaden 20mL de cloro comercial y se afora a 500mL con agua destilada.

11.2.2. Terpenos (Peña. 2004)

La técnica que se empleó para la cuantificación de terpenos fue la cromatografía de gases, empleando una miro-extracción en fase sólida (GC-SPME). Para la micro-extracción se empleó una fibra de divenilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 50/30µm), las condiciones del pre-equilibrio fue a 37°C durante 2 horas con agitación constante a 280rpm, la condición de equilibrio con la fibra expuesta fue de 37°C durante media hora a 100rpm.

Los compuestos que se analizaron fueron: limoneno, p-cimeno, linalool, 4-terpineol, α-terpineol, citronelol, nerol, geraniol.

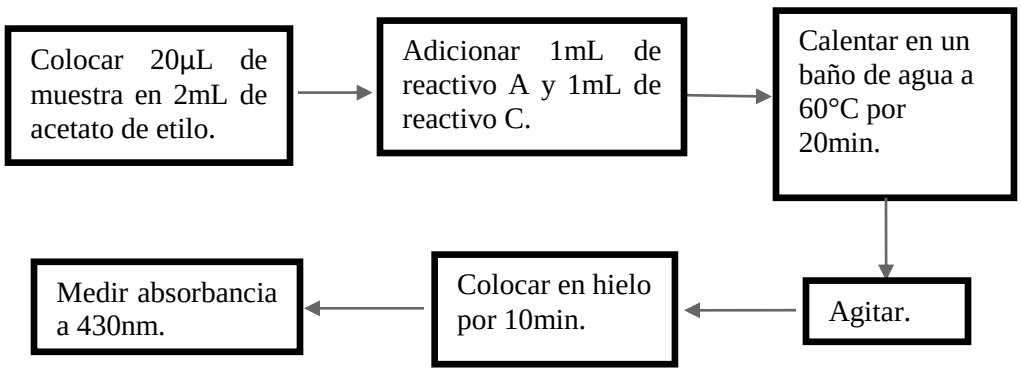
Se empleo el cromatografo *Shimadzu* GC 2010 cuyas condiciones fueron, en el horno al inicio 40°C, aumentando 3°C/min hasta 120°C y finalmente 6°C/min hasta alcanzar los 200°C, la temperatura del detector es de 250°C y la del inyector es de 240°C, el gas acarreador fue el nitrógeno. La columna que se empleo fue de polidimetilxiloxano modelo DB-FFAP (50m x 0.32mm x 0.50μm).

11.2.3. Saponinas (Baccou. 1977)

Para la cuantificación de las saponinas se utilizo el método colorimétrico propuesto por Baccou y col. en 1977. Consiste en una hidrólisis ácida para después medir la sapogenina (ver figura 11.2.3.1.). La solución estándar que se preparó para hacer la curva de calibración fue de diosgenina ya que es una saponina esteroidal y como se mencionó anteriormente en el agave predominan las saponinas de este tipo. La concentración que se empleó fue 100ppm en metanol. Como se menciona en la figura 11.2.3.1. se utilizan dos reactivos para la cuantificación de las saponinas el reactivo A y C.

Para la preparación del reactivo A se mezclan 0.5mL de anisaldehído y 99.5mL de acetato de etilo, mientras que el reactivo C es ácido sulfúrico al 50%.

Figura 11.2.3.1. Diagrama de flujo para la cuantificación de saponinas esteroidales



La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro *genesys 10UV* de la empresa *Thermo Electro Corporation.*

11.3. Selección de cepas

Se seleccionaron ocho cepas mayoritarias de los estados productores de mezcal cinco no-*Saccharomyces* (*C. ethanolica, K. marxianus, T. delbrueckii, Z. bisporus*) y tres *Saccharomyces cerevisiae*.

11.3.1. Conservación de las levaduras aisladas

Las cepas seleccionadas (cuadro 10.5.2.1.), se conservaron en medio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) al 50% de glicerol en crioviales a -70°C y en medio sólido YPD a 4°C.

Para preparar un 1L de YPD se utilizaron 20g bactopeptona, 10g de extracto de levadura, 20g de dextrosa, una vez preparado el medio YPD se ajustó a un pH de 4.5. Para hacer el medio sólido se adicionaron 2% de agar-agar a la solución.

11.4. Cinética de crecimiento en medio sólido y líquido

Para la cinética en medio sólido se prepararon cajas donde se utilizó el jugo de agave a 40g/L, se ajustó el pH 4.5 para posteriormente adicionarle 2% de agar-agar.
Las condiciones de crecimiento fueron a 30°C y se observó la formación de colonias comparando con un medio rico (YPD), cada 24h hasta completar las 96h.

Para la cinética en medio líquido se preparó YPD a pH 4.5. Las condiciones de crecimiento fueron 30°C y 300rpm, se tomó muestra cada 2h hasta observar que la levadura alcanzó su estado estacionario.

11.5. Capacidades fermentativas

Para la evaluación de las capacidades fermentativas de las levaduras, se realizaron fermentaciones en matraces empleando los jugos de *A. angustifolia*, *A. cupreata*, *A. durangensis* y *A. tequilana* a una concentración de azúcares inicial de 140g/L con un pH de 4.5. Solo el del

jugo de *A. salmiana* se empleó con una concentración de azúcares inicial de 110g/L, debido a la falta de azúcares presentes en el jugo que se extrajo, las condiciones de fermentación fueron de 30°C y 100rpm. La toma de muestra se realizó cada 4h hasta completar 16h, después cada 6h hasta completar 40h, y finalmente cada 8h hasta completar las 72h. Las pruebas analíticas que se realizaron fueron las que se presentan en las secciones subsecuentes.

11.5.1. Determinación de la población (Hérnandez. 2007).

Para la cuantificación de levaduras se empleó la cámara de *Neubauer*, que está dividida en tres partes: dos laterales y una central.

La parte central es más baja que las dos laterales y cuenta con una cuadrícula de $1mm^2$ dividida en 400 cuadros pequeños, que están agrupados en 25 cuadros grandes que hacen el total de la cuadricula.

Sobre la cámara se coloca un cubre-objeto dejando un espacio de 1mm por el cual se coloca una pequeña cantidad de muestra en la cámara, la muestra entra a la cámara por medio de la capilaridad, posteriormente se hace una lectura en el microscopio con un lente 40X. La concentración de células por mililitro se determina con la ecuación.

$$X = \left(\frac{NC}{NK}\right)(D)(0.25 \times 10^6) \qquad (11.5.1.1.)$$

Donde X= millones de células por mililitro, NC= número de células contadas, NK= número de cuadros contados, D= Dilución de la muestra.

Con fines estadísticos solo se cuentan los cuadros que se encuentran en las esquinas y el centro, teniendo de esta manera un total de diez cuadros.

Finalmente se determinó la biomasa presente al inicio y al final de la fermentación por peso seco, centrifugando las muestras a una velocidad de 10,000rpm durante 15min, el equipo que se utilizó fue la centrifuga SOL-BAT C-600, el sobrenadante fue utilizado para realizar los análisis de azúcares, etanol y compuestos volátiles, mientras que el precipitado fue lavado con agua destilada y centrifugado dos veces durante 15min, después la pastilla obtenida se re-suspendió en 5mL de agua destilada en un recipiente de plástico previamente secado y pesado, misma que se

colocó en una estufa a una temperatura de 51°C a sequedad, finalmente se dejó enfriar en un desecador y se pesó el recipiente con la muestra seca, durante todo el proceso de manipulación de los recipientes de plástico se utilizaron pinzas para evitar la variación de peso. Con la diferencia de peso del recipiente al inicio y al final se determinó la biomasa generada.

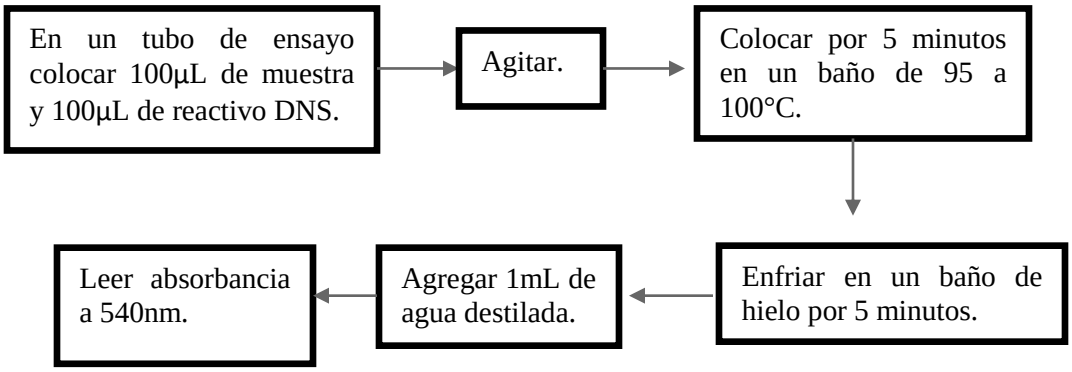
11.5.2. Azúcares (Hérnandez. 2007)

Para la cuantificación de azúcares se utilizó la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método se basa en la reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cuando los grupos aldehídos son oxidados por los grupos carboxilos.

La preparación de la solución de DNS se realizó disolviendo 10g de hidróxido de sodio, 200g de tartrato de sodio y potasio, 0.5g de metabisulfito de sodio y 2g de fenol en 600ml de agua destilada. Posteriormente se adicionan 10g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, el ácido debe de adicionarse poco a poco hasta lograr su completa dilución. Finalmente se afora a un litro con agua destilada.

Con la técnica de DNS se cuantificaron los azúcares reductores directos. El protocolo a seguir es el que se presenta en la figura 11.5.2.1., posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540nm en un lector de microplacas *Bio-Rad* modelo 680XR.

Figura 11.5.2.1. Determinación de azúcares reductores directos (cuantificación por DNS)



Los valores leídos en el lector de microplacas son convertidos a valores de concentración (g/L) mediante una curva de calibración, que se obtuvo preparando diferentes niveles de concentración de azucares (glucosa o fructosa) siendo el nivel más alto de 2g/L.

11.5.3. Etanol y compuestos volátiles (Alcázar. 2008)

La determinación de etanol y compuestos volátiles se realizó por medio de un equipo muestreador *head space* (*Head Space Hewlett Packard* modelo HP 7694E) acoplado a un cromatógrafo de gases (*Hewlett Packard* modelo HP 6890) con un detector de ionización de flama. La separación de los compuestos se realizó en una columna capilar de polietilenglicol HP innowax de 60m x 0.32mm x 0.25µm. El gas acarreador fue helio, el aire e hidrógeno hacían encender la flama, mientras que el nitrógeno hace la función de reducir el ruido.

El horno se programó de acuerdo con la siguiente rampa de temperatura: 55°C por 5 minutos, posteriormente aumenta la temperatura 5°C/min hasta 160°C, finalmente se aumenta la temperatura 25°C/min hasta 220°C y se mantiene en 220°C por 8 minutos.

Las condiciones del *head space* fueron las siguientes: temperatura del vial 80°C, la temperatura de *loop* 110°C, la temperatura de línea de transferencia 115°C, el tiempo de equilibrio del vial 5min, tiempo de presurización 0.2min, tiempo de llenado de *loop* 0.2min, tiempo de equilibrio de loop 0.5min, inyección 1min, el ciclo del *head space* y el cromatografo es de 45min.

Para la inyección de las muestras fue necesario utilizar viales de 20mL, colocándose 2mL de muestra en cada vial, posteriormente los viales son engargolados con una tapa que consiste en una argolla de aluminio-planta con una apertura de seguridad y de tapón de PTFE de silicón blanco de 20mm. Las muestras dispuestas en los viales se colocaron en el carrusel del *head space* que cuenta con 12 espacios disponibles.

Los compuestos volátiles analizados fueron: acetaldehído, acetato de etilo, metanol, etanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, alcoholes amílicos, caprato de etilo, lactato de etilo, 2-furfuraldehido, 5-hidroximetil-2 furfuraldehído y caproato de etilo.

Previamente al análisis de las muestras, se realizó una solución madre de compuestos volátiles anteriormente mencionados, para de esta forma obtener las diferentes curvas de calibración de los diferentes compuestos, que iban de las 1000ppm a 1ppm, y así calcular la concentración de los compuestos volátiles presentes en las muestras, mientras que la concentración de etanol oscilaba de 100 a 1g/L.

Una vez analizadas las muestras obtenidas en las cinéticas de fermentación se procede a realizar el tratamiento de datos para poder obtener las velocidades de consumo de sustrato ($r_{s\ máx,}$ g/Lh), de producción de etanol ($r_{p\ máx,}$ g/Lh) y de formación de biomasa ($r_{x\ máx,}$ cel/mLh).
Debido a que se conoce que la velocidad es una derivada de la biomasa, etanol y azúcar residual respecto al tiempo, se pueden emplear métodos numéricos para la obtención de estos resultados. Para el presente trabajo se utilizó la ecuación que a continuación se presenta.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{\ln(x_3) - \ln(x_1)}{t} x_2 \qquad (11.5.3.1)$$

Previo al cálculo de las velocidades se ajustaron los datos a un modelo matemático con el programa curve *fit expert* (cuadro 11.5.3.1).

Cuadro 11.5.3.1. Modelos matemáticos

Modelo	Ecuación
Harris	$y = \frac{1}{(a + bx^c)}$
MMF	$y = \frac{(ab + cx^d)}{(b + x^d)}$
Logístico	$y = \frac{a}{(1 + be^{-cx})}$
Richard	$y = \frac{a}{(1 + e^{b-cx})^{1/d}}$

Además de las velocidades, se calculó también el porcentaje alcohol volumen:

$$v/v\,\% = \frac{\left(\frac{conc.final\ alcohol}{\rho}\right)}{1000} * 100 \qquad (11.5.3.2)$$

12. Resultados y discusión

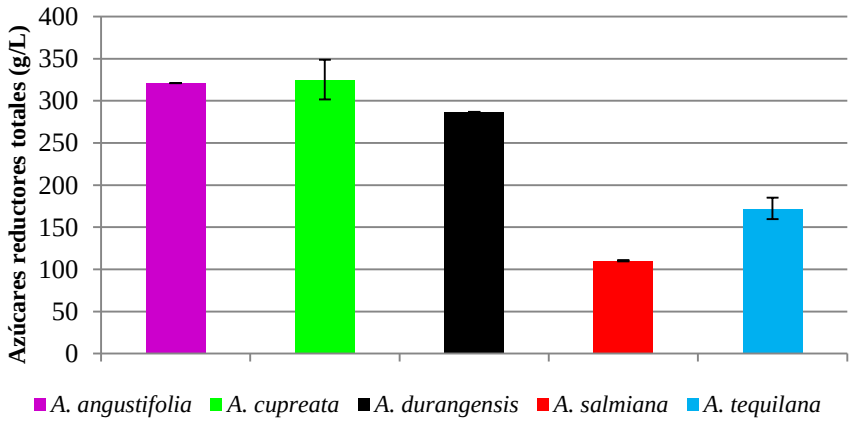
12.1. Composición química del jugo agave cocido

La composición del agave es compleja (sección 10.3). El conocimiento de algunos elementos de la composición química de los diferentes jugos de *Agave* cocido muestreadas, nos permite tener una visión más amplia sobre el comportamiento de la levadura en su crecimiento y fermentación, debido a que de la materia prima la levadura toma los nutrientes necesarios para poder crecer y fermentar. En este sentido realizamos un estudio para conocer la composición química de los principales componentes en el jugo de agave cocido de diferentes especies utilizadas en el proceso de producción de mezcal.

12.1.1. Azúcares reductores directos

Para la cuantificación de los azúcares reductores directos en los diferentes jugos de agave cocido se empleó la técnica de DNS (figura 11.5.2.1.). La gráfica 12.1.1.1. presenta las concentraciones obtenidas. Se observó que los jugos de *A. angustifolia* y *A. cupreata* tuvieron las concentraciones más elevadas, mientras que el jugo de *A. salmiana* tuvo la menor concentración.

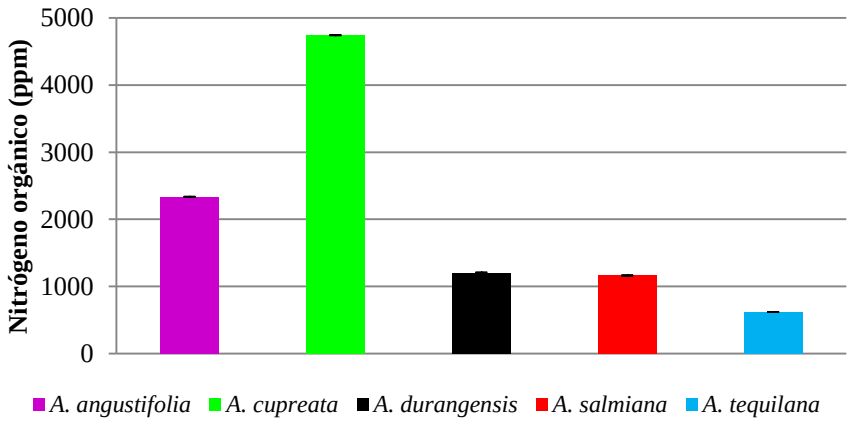
Gráfica 12.1.1.1. Concentraciones de azúcares reductores totales en los diferentes jugos de agave cocido



12.1.2. Nitrógeno

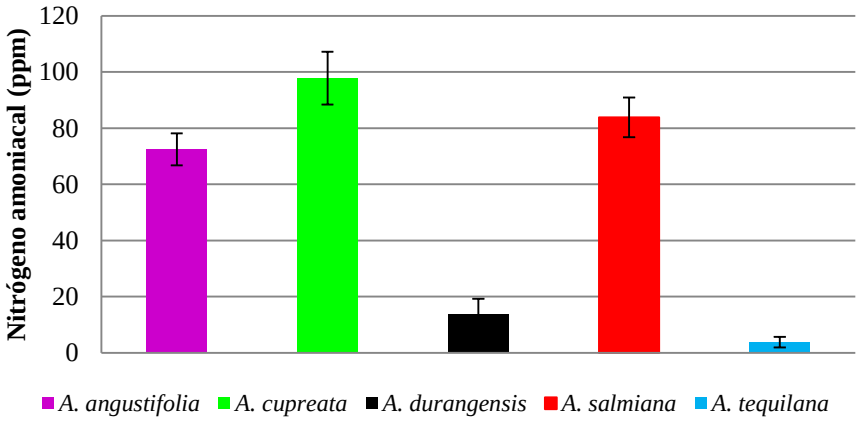
Se cuantificó el nitrógeno orgánico y el amoniacal empleando técnicas colorimétricas (sección 11.2.1.). Los resultados obtenidos del análisis de nitrógeno orgánico y amoniacal se presentan en las gráficas 12.1.2.1. y 12.1.2.2. respectivamente.

Gráfica 12.1.2.1. Concentración de nitrógeno orgánico en los diferentes jugos de agave cocido



La gráfica 12.1.2.1. muestra que el jugo de *A. cupreata* presenta una alta concentración de nitrógeno orgánico. Mientras que en jugo de *A. tequilana* es el jugo que posee una baja concentración de este compuesto.

Gráfica 12.1.2.2. Concentración de nitrógeno amoniacal en los diferentes jugos de agave cocido



En la gráfica 12.1.2.2. se observa la concentración de nitrógeno amoniacal presente en los diferentes jugos. Obteniendo como resultado que el jugo de *A. cupreata* es el que tuvo una mayor concentración de nitrógeno amoniacal, y nuevamente el jugo de *A. tequilana* tuvo la menor concentración de este compuesto. Por otro lado, se observó que el jugo de *A. salmiana* tuvo altas concentraciones de nitrógeno amoniacal pero bajos niveles de nitrógeno orgánico.

Con los resultados obtenidos de azúcares reductores directos y nitrógeno se calculó la relación carbono/nitrógeno (C/N), que estará disponible para las levaduras durante las fermentación realizadas en el presente estudio, El jugo de agave mejor balanceado es el *A. cupreata*, con una relación C/N de 68, mientras que el *A. tequilana* tiene la mayor deficiencia de nitrógeno debido a que su relación C/N es de 276, seguido por el *A duranguensis* con una relación C/N de 237. Finalmente, el *A. angustifolia* y el *A. salmiana* tuvieron una relación C/N de 137 y 95 respectivamente.

Pinal y col. en 1997, estudiaron la relación de carbono nitrógeno en jugo de *A. tequilana* encontrando que una deficiencia de nitrógeno incrementa significativamente la generación de alcoholes superiores (Pinal. 1997). Díaz Montaño y col. en 2009, obtuvieron en su estudio que la falta de nutrientes asimilables impide el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* especialmente *Kloeckera*, también mencionaron que adicionar nutrientes como el nitrógeno, activan la fermentación y la habilidad de la *S. cerevisiae* de metabolizar ambos tipos de fuente de nitrógeno (orgánica e inorgánica) (Díaz. 2009). Finalmente Arrizon y Gschaedler en el 2002, mencionaron que la demanda de nitrógeno de las cepas es diferente aun siendo cepas de la misma especie(Arrizon. 2002). En este contexto se ha reportado que cepas de la misma especie que presentan baja demanda de nitrógeno corresponden a aquellas con las más altas velocidades de fermentación, esto se puede deber a que estas cepas pueden hacer uso del nitrógeno "eficientemente" para la reactivación de la síntesis de proteínas, especialmente para el transporte de azúcares. Estos estudios muestran que la demanda de nitrógeno por la levadura puede ser otro criterio de selección para la fermentación de cepas, debido a que el nitrógeno es uno de los principales factores limitantes durante la cinética de fermentación (Manginot. 1998).

Por lo tanto, conocer la concentración de azúcares presentes en el medio además de la cantidad de nitrógeno nos permite estimar su disponibilidad para su consumo por las levaduras durante su crecimiento y fermentación. Además en lo que se refiere a la fermentación conocer la concentración de nitrógeno presente en el medio nos permite elucidar el comportamiento de la levadura en cuanto a la producción de alcoholes superiores (anexo 2). No obstante en el presente trabajo sólo se estudió de manera global la cantidad de azúcares y nitrógeno presente en los diferentes jugos, por lo que para estudios posteriores se sugiere hacer un estudio más robusto de la concentración y tipo de azúcares, aminoácidos y nitrógeno presentes en los jugos.

12.1.3. Terpenos

Los terpenos son compuestos que proporcionan notas aromáticas agradables, se encuentran en la materia prima y además se pueden producir en la fermentación por acción de la enzima β-glicosidasa presente en algunas levaduras o bien son el producto de una biotransformación (King. 2000), debido a esto, se realizó un estudio para determinar la composición de los terpenos en los jugos cocidos utilizados de las diferentes especies de *Agave*. Los monoterpenos analizados fueron: limoneno, p-cimeno, linalool, 4-terpineol, α-terpineol, citronelol, nerol, geraniol. Para su cuantificación se empleó la técnica de microextracción y se analizaron por cromatografía de gases (sección 11.2.2.).

Se detectó la presencia de limoneno y p-cimieno a diferentes concentraciones en los jugos de las cinco especies de *Agave* cocido (cuadro 12.1.3.1). En el jugo de *A. angustifolia* no se detectó 4-terpineol. El citronelol solo se encontró en el jugo de *A. cupreata*, mientras que en jugo *A. salmiana* no se detectó linalool, α-terpineol y geraniol. Finalmente el nerol no se encontró en ninguna de las cinco especies de jugos de *Agave* cocido analizados. Es importante mencionar que en los cuatro jugos de agave cocido donde se detectó α-terpineol es el compuesto mayoritario, ya que se presenta en altas concentraciones (gráfica 12.1.3.1). Finalmente, se determinó la proporción de estos compuestos en los diferentes jugos de agave cocido (gráfica 12.1.3.1.), se observó que la composición del *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. durangensis* tienen una proporción similar de terpenos, mientras que el *A. cupreata* tiene una mayor diversidad de compuestos.

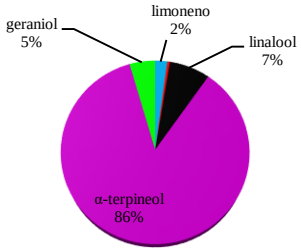
Cuadro 12.1.3.1. Concentración de monoterpenos en los jugos de agave cocido

Compuesto	*A. angustifolia* (ppm)	*A. cupreata* (ppm)	*A. durangensis* (ppm)	*A. salmiana* (ppm)	*A. tequilana* (ppm)
Limoneno	0.017 ± 0.001	0.743 ± 0.487	0.021 ± 0.001	0.014 ± 0.0007	0.016 ± 0
p-cimeno	0.004 ± 0.0004	0.023 ±0.008	0.002 ± 0	0.001 ± 0	0.003 ± 0.0001
Linalool	0.059 ± 0.0038	0.041 ± 0.001	0.068 ± 0.008	Nd	0.023 ± 0.0059
4-terpineol	Nd	0.009 ± 0	0.016 ± 0.002	0.002 ± 0	0.016 ± 0.0017
α-terpineol	0.698 ± 0.0206	1.269 ± 0.004	1.671 ± 0.170	Nd	1.331 ± 0.154
Citronelol	Nd	0.011 ± 0	Nd	Nd	Nd
Nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Geraniol	0.037 ± 0.0091	0.053 ± 0	0.033 ± 0.002	Nd	0.029 ± 0.0038

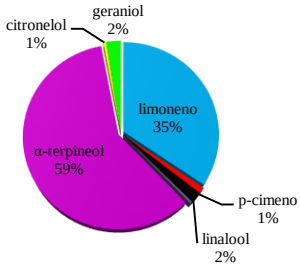
Nd= No detectado, Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Gráfica 12.1.3.1. Proporción de monoterpenos en jugo cocido de **a.** *A. angustifolia*, **b.** *A. cupreata*, **c.** *A. durangensis*, **d.** *A. salmiana*, **e.** *A. tequilana*.

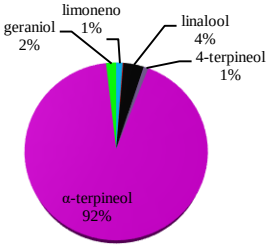
a



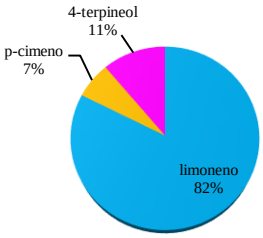
b



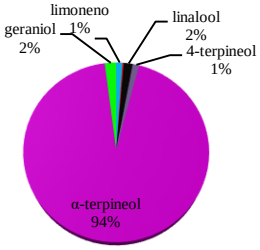
c



d



e



De los resultados obtenidos por Peña y col. en 2004, se comprobó que el limoneno y el p-cimeno se encuentran presentes en los diferentes jugos de *Agave.* Sin embargo, se observan varias diferencias, ellos reportan la presencia de nerol en *A. angustifolia* y *A. tequilana* así como la presencia de geraniol y linalool en *A. salmiana*, mientras que en el presente trabajo no se detectaron. Es importante mencionar que ellos analizaron la presencia de estos compuestos en las especies de *Agave* crudas por lo que se podría concluir que las discrepancias en la ausencia de estos compuestos en los jugos de *Agave* cocidos puede deberse por un lado a la degradación de los mismos en la etapa de cocimiento, debido a que estos compuestos son termolábiles y las altas temperaturas del cocimiento pueden ocasionar su degradación (Peña. 2004).

12.1.4. Saponinas

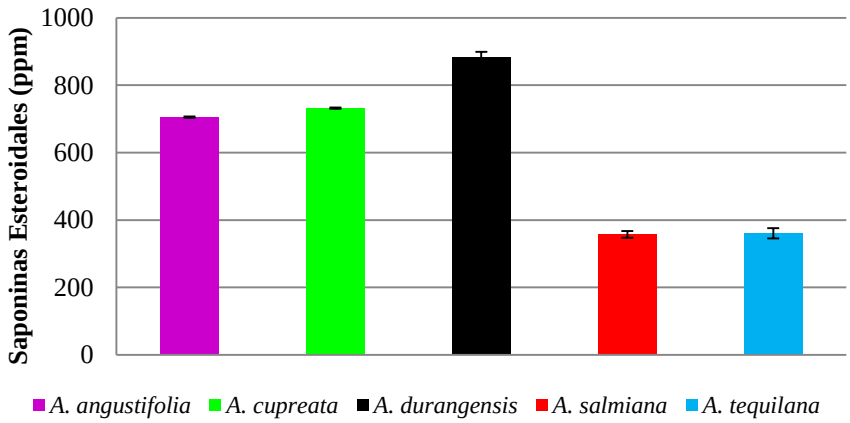
Los agaves como ya se mencionó en la fundamentación son plantas semidesérticas, por lo que se encuentran en ambientes secos o semisecos y es necesario que generen todo un sistema de adaptación y de defensa que les permita sobrevivir a ese medio ambiente. Entre los compuestos más conocidos producidos por los agaves para su defensa contra patógenos se cuenta a las saponinas, que es bien sabido pueden limitar el desarrollo de la fermentación alcohólica (Shiau. 2009), es por esto que se decidió determinar si los jugos de agave contenían niveles suficientes de saponinas que pudieran afectar las capacidades de las levaduras.

Para la cuantificación de saponinas se utilizó el método colorimétrico propuesto por Baccou (Baccou. 1977). La concentración de saponinas totales se muestra en la gráfica 12.1.4.1 en donde podemos apreciar que el jugo de *A. durangensis* se diferenció de los demás jugos al mostrar la concentración más elevada (882.7ppm), seguido de los jugos de *A. angustifolia* y *A. cupreata* (705.3 y 732.1ppm respectivamente) y finalmente los jugos de *A. salmiana* y *A. tequilana* que tuvieron concentraciones de 357.3 y 360.8ppm respectivamente.

Estos resultados no pudieron ser comparados con otros autores, debido a que no se encontró literatura disponible al respecto, solo se encontraron trabajos del efecto de las saponinas sobre las levaduras como el de Miyakoshi y col. en el 2000, donde se estudió la inhibición de 14 saponinas esteroidales de *Yucca schidigera* en diferentes cepas de levadura (*C. albicans, D. hansenii, H. anomala, K. apiculata, P. nakazawae. S. cerevisiae*). La inhibición está relacionada a su

estructura química, de esta forma las saponinas que tienen una cadena ramificada de trisacáridos sin ningún enlace con oxígeno en las posiciones de C-2 y C-12 exhiben una potente actividad inhibitoria, mientras que las saponinas con enlaces 2β-hidroxil muestran una actividad débil o ninguna actividad. Finalmente las saponinas que muestran en la mitad de su estructura enlaces de disacáridos muestra poca actividad inhibitoria (Miyakoshi. 2000).

Gráfica 12.1.4.1. Concentración total de las saponinas esteroidales presentes en los diferentes jugos de agave cocido



En el presente trabajo sólo se cuantificaron las saponinas totales presentes en el jugo de agave cocido. No obstante, se sabe por trabajos anteriores que las saponinas están presentes en diferentes concentraciones dependiendo de la especie de *Agave* (Gaward. 1999; Yokosuka. 2009).

Por lo tanto, es importante conocer más a detalle qué saponinas son las mayoritarias en los diferentes jugos de agave por lo que se sugiere para trabajos posteriores hacer un estudio de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas.

12.2. Crecimiento en medio sólido y cinética de crecimiento en medio líquido

Para evaluar si todas las cepas utilizadas en el presente trabajo podían crecer en los diferentes jugos de agave se evaluó el crecimiento en medio sólido en cajas petri como se mencionó en el apartado 11.4, comparado con la formación de colonias con un medio rico (YPD). En el cuadro 12.2.1 se puede apreciar que las levaduras de la especie *S. cerevisiae* (AR5, MC4 y ZAC1) no

crecen en los jugos de *A. durangensis* y *A. salmiana*. Además la cepa DI1 (*T. delbrueckii*) tampoco crece en jugo *A. salmiana*. La medida del crecimiento se realizó hasta completar 96 horas (sección 11.4), sin embargo, solo se muestra los resultados obtenidos a las 24 horas debido a que este es el tiempo suficiente para que la levadura pueda crecer en un medio rico como el YPD.

Cuadro 12.2.1. Crecimiento en medio sólido.

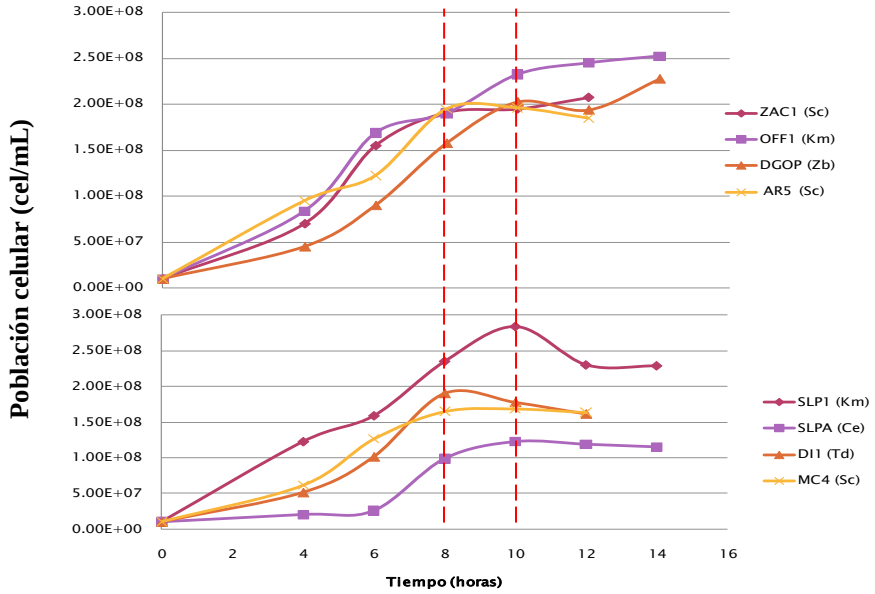
	Crecimiento de la levadura transcurridas 24 horas							
Levadura / Jugo	**AR5**	**MC4**	**ZAC1**	**OFF1**	**SLP1**	**SLPA**	**DI1**	**DGOP**
A. angustifolia.	++	++	++	++	++	++	++	++
A. cupreata.	++	++	++	++	++	++	++	++
A. durangensis.	-	-	-	++	++	++	+	++
A. salmiana.	-	-	-	++	++	++	-	+
A. tequilana.	++	++	++	++	++	++	++	++

++ Crecimiento normal de las colonias, + Existencia de pocas colonias, - Ausencia de colonias

Finalmente se observó que todas la cepas crecieron satisfactoriamente en los jugos de *A. angustifolia*, *A. cupreata* y *A. tequilana* (cuadro 12.1.4.1).

Antes de realizar las fermentaciones fue necesario realizar una cinética de crecimiento en un medio rico líquido (YPD) con el objetivo de conocer el tiempo en el que la levadura llega a su estado estacionario (figura 10.5.2.1) y así saber en qué tiempo se tienen células con homogeneidad fisiológica para poder fermentar. Las cinéticas de crecimiento en medio líquido se realizaron en medio YPD muestreando cada dos horas hasta llegar al estado estacionario de la levadura. Teniendo como resultado que las cepas de las especies *S. cerevisiae* (AR5, MC4, ZAC1), *K. marxianus* (OFF1) *T. delbrueckii* (DI1) y la *Z. bisporus* (DGOP) alcanzan su estado estacionario transcurridas las 8h, mientras que las cepas las especies *C. ethanolica* (SLPA) y la *K. marxianus* (SLP1) alcanzan dicho estado transcurridas 10h (gráfica 12.2.1.)

Gráfica 12.2.1. Cinética de crecimiento en medio líquido (YPD).



En la cuadro 12.2.2. se muestran las velocidades máximas de crecimiento específico($\mu_{máx,}$ h^{-1}). Se observó que las cepas de la especie *S. cerevisiae* presentaron velocidades específicas similares. No obstante, las cepas de la especie *K. marxianus* varían sus velocidades específicas entre una cepa y otra. En este contexto, Fonseca y col. en 2007, estudiaron la fisiología de *K. marxianus*, encontrando que la velocidad especifica de crecimiento puede variar de una cepa a otra (Fonseca. 2007). Por lo que se puede suponer que la historia de preservación y manipulación de esta cepa juega un papel importante en la fisiología de la *K. marxianus.*

Finalmente, la cepa SLPA presentó la velocidad de crecimiento específico más baja.

Cuadro 12.2.2. Velocidades máximas de crecimiento específicas de las levaduras mezcaleras.

	AR5 (*S.cerevisiae*)	MC4 (*S.cerevisiae*)	ZAC1 (*S.cerevisiae*)	OFF1 (*K.marxianus*)	SLP1 (*K.marxianus*)	SLPA (*C.ethanolica*)	DI1 (*T.delbrueckii*)	DGOP (*Z.bisporus*)
$\mu_{máx}$ (h^{-1})	$0.44_{\pm 0.01}$	$0.42_{\pm 0.04}$	$0.46_{\pm 0.01}$	$0.53_{\pm 0.04}$	$0.63_{\pm 0.03}$	$0.26_{\pm 0.01}$	$0.37_{\pm 0.01}$	$0.35_{\pm 0.01}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

12.3. Capacidades fermentativas

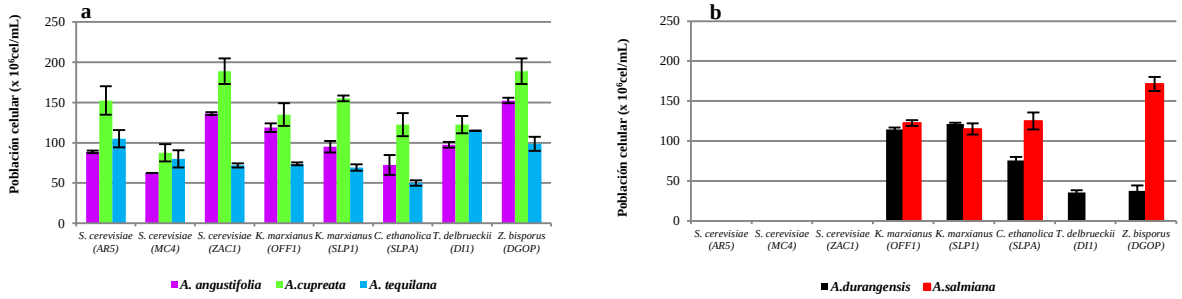
Una vez realizadas las cinéticas de crecimiento en medio sólido y líquido se llevaron a cabo las fermentaciones en los diferentes jugos de agave, con el fin de obtener las capacidades fermentativas de las cepas en cada uno de los jugos de agave (sección 11.5.).

Las cinéticas de fermentación se realizaron hasta transcurrir 72h, se tomaron muestras cada 4h hasta completar 16h, después cada 6h completar 40h, y finalmente cada 8h hasta completar las 72h. Los resultados obtenidos se presentan en las secciones subsecuentes.

12.3.1. Población celular

Para la determinación de la población se utilizó la cámara de *Neubauer* (sección 11.5.1.). En las graficas 12.3.1.1a y 12.3.1.1b se muestra la población de levaduras que se obtuvo al final de las diferentes fermentaciones (72h). En cada una de las fermentaciones se inoculó con 10 millones de células. Como se aprecia en las graficas 12.3.1.1 a y b, se observó una gran diferencia del crecimiento celular en los diferentes jugos de agave.

Gráfica 12.3.1.1. Concentración de la población celular en los jugos de **a.** *A. angustifolia*, *A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72h)



En jugo de *A. cupreata* se obtuvo la mayor concentración de población en las ocho cepas de levaduras, esto se le puede atribuir a que este jugo presentó la mayor concentración de nitrógeno orgánico y amoniacal, que es uno de los nutrientes indispensables para el crecimiento celular de las levaduras. Guitart y col. en 1999 observaron que si el medio es rico en aminoácidos puede influenciar la actividad metabólica de las levaduras, ya que el metabolismo proteico es alto y probablemente estas condiciones son favorables para el crecimiento de la levadura (Guitart. 1999).

No obstante, en jugo de *A. durangensis* y *A. salmiana* se observó que no crecieron las cepas de la especie *S. cerevisiae.* También en jugo de *A. salmiana* no creció la cepa DI1 (*T. delbrueckii*). Además, se observó que las condiciones presentes en jugo de *A. durangensis* causaron una

mayor inhibición a las cepas utilizadas, lo que puede atribuirse a la presencia de saponinas en este jugo, causando dificultad en el crecimiento de las levaduras (gráfica 12.1.4.1.). Finalmente se observó que las dos cepas de la especie *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) se adaptaron satisfactoriamente a los cinco jugos de *Agave* (anexo 3).

Realizando el análisis estadístico del crecimiento de las diferentes poblaciones de levaduras, se determinó que no existen diferencias estadísticas entre los jugos de *A. cupreata* y *A. angustifolia,* y entre los jugos *A. durangensis* y *A. tequilana*. Además se observó que no existen diferencias significativas en el crecimiento entre cepas de la misma especie sobre los diferentes jugos (anexo 5).

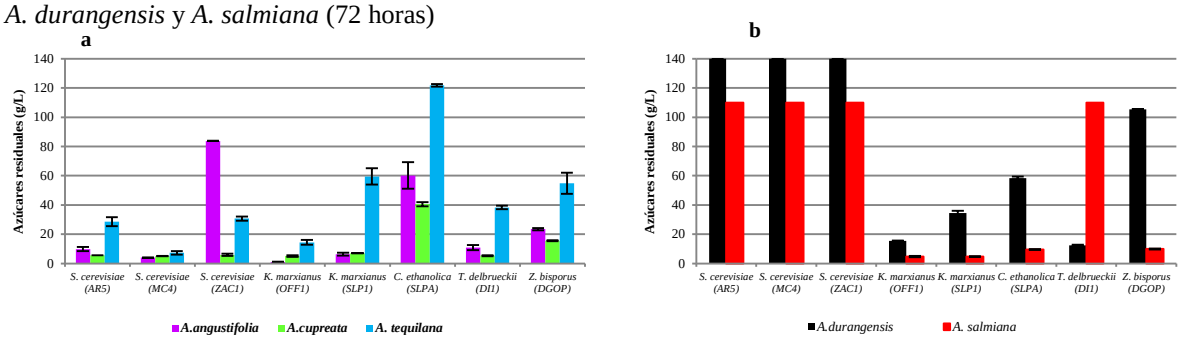
12.3.2. Azúcares

Para calcular la concentración de azúcares residuales se empleó la técnica de DNS (figura 11.5.2.1.). En el consumo de azúcares se observó que en general, en jugo de *A. cupreata* las ocho cepas de levadura consumieron en su totalidad los azúcares (gráficas 12.3.2.1a y 12.3.2.1b). Se confirmó que en jugo de *A. durangensis* las levaduras no se adaptaron al medio ya que la cantidad de azúcares residuales es elevada (anexo 3).

Las dos cepas de *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) fermentaron en los diferentes jugos de agave, consumiendo los azúcares presentes. En la literatura se reporta que las levaduras de esta especie tienen la particularidad de adaptarse y consumir diferentes fuentes de carbono para producir biomasa, aun siendo esta fuente el factor limitante (Fonseca. 2007; Lane. 2010). Por lo tanto, podemos observar que independientemente del tipo de jugo las dos cepas de esta especie asimilaron los azúcares presentes en el medio.

En el análisis estadístico de los jugos se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los jugos *A. angustifolia* y *A. durangensis,* y entre los jugos *A. durangensis* y *A. tequilana* esto se debe a que las cepas ZAC1 y SLPA no se adaptaron a estos medios dejando altas concentración de azúcares residuales (gráficas 12.3.2.1a y 12.3.2.1b).

Gráfica 12.3.2.1. Concentración de azúcares residuales en los jugos de **a.** *A. angustifolia, A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72 horas)



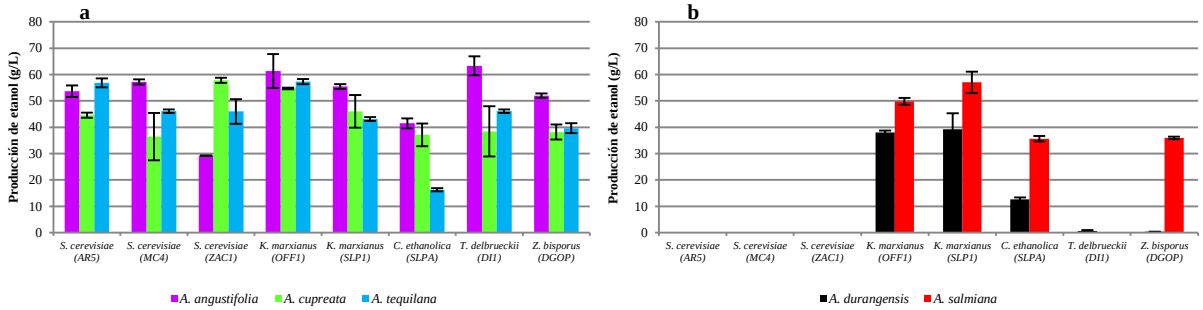
El análisis estadístico de las cepas mostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas de la especie *K. marxianus* (OFF1 y SLP1). Las cepas de género *Saccharomyces* si presentan diferencias significativas entre ellas, con esto se observa que aunque sean cepas del mismo género las levaduras no consumen la misma cantidad de azúcares (anexo 5).

12.3.3. Etanol

Para la cuantificación del etanol se empleó la cromatografía de gases acoplado a un *head space* (sección 11.5.3.). En las gráficas 12.3.3.1a.y 12.3.3.1b. se observa que las levaduras produjeron una mayor cantidad de etanol en jugo *A. angustifolia*, solo la cepa ZAC1 produjo una mayor cantidad de etanol en jugo de *A. cupreata* (anexo 3). De acuerdo con el análisis de varianza existen diferencias significativas en la producción de etanol con el jugo de *A. durangensis*.

Se observó que las cepas de la especie *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) producen altas concentraciones de etanol en los cinco jugos de agave, concentraciones que igualan o superan la producción de etanol por las cepas del género *Saccharomyces* (AR5, MC4, ZAC1), y de acuerdo con el análisis estadístico no existen diferencias en la producción de etanol con las cepas del mismo género.

Gráfica 12.3.3.1. Producción de etanol en los jugos de **a.** *A. angustifolia*, *A. cupreata* y *A. tequilana* **b.** *A. durangensis* y *A. salmiana* (72 horas)



De los resultados obtenidos en las secciones anteriores se concluye que a las cepas de las especies *S. cerevisiae*, *C. ethanolica*, *T. delbrueckii* y *Z. bisporus* se les dificultó adaptarse al jugo de *A. durangensis*, lo anterior se le puede atribuir a la presencia de inhibidores como pueden ser las saponinas (grafica 12.1.4.1). Además el jugo de *A. durangensis* presenta bajas concentraciones de nitrógeno orgánico y amoniacal (gráficas 12.1.2.1 y 12.1.2.2.), por lo tanto la carencia de nutrientes y la alta concentración de inhibidores ocasionan que la levadura no pueda crecer y por ende fermentar.

Finalmente, se observó que las cepas de *K. marxianus* son las que produjeron una mayor población y concentración de etanol en los cinco jugos, a diferencia del vino en donde las cepas del genero *Saccharomyces* son las que producen una mayor concentración de etanol y se mantienen a lo largo de la fermentación. Esta especie de levadura al parecer juega un papel importante en la producción de mezcal y de todas las bebidas fermentadas de agave, debido a que se ha detectado su presencia en los procesos de fermentación (Lappe. 2008).

Lane y Morrissey en 2010, publicaron que las levaduras de la especie *K. marxianus* pueden llegar a tener una gran aplicación en la industria debido a que son cepas que tienen una velocidad de crecimiento elevada, son termo tolerantes, tienen la capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares, secreción de enzimas (inulinasas, β-glactosidasas y pectinasas) y producción de etanol en la fermentación (Lane. 2010). En este último punto, en la literatura se reporta que las cepas de la especie *K. marxianus* tienen la habilidad de producir etanol a temperaturas por arriba del los

40°C (Fonseca. 2008). Nonklang y col. en 2008 realizaron fermentaciones alcohólicas con *S. cerevisiae* y *K. marxianus* utilizando diferentes sustratos, encontrando que las *K. marxianus* se adaptaron mejor a los diferentes tipos de sustratos, y que produjeron concentraciones similares de alcohol a 30°C ambas levaduras (*S. cerevisiae* y *K. marxianus*). No obstante, cuando fermentaron a temperatura de 45°C la cepa *S. cerevisiae* no creció y la cepa *K. marxianus* creció y fermentó (Nonklang. 2008).

12.3.4. Parámetros cinéticos

Una vez realizadas las fermentaciones se prosiguió a realizar los cálculos de los parámetros cinéticos (cuadro 11.4.3.1). Se calculó el rendimiento de formación de biomasa sobre sustrato consumido ($Y_{x/s,}$ g células/g azúcares), y el de formación de etanol sobre sustrato consumido ($Y_{p/s,}$ g etanol/g azúcares), las velocidades de formación celular ($r_{x\ máx,}$ cel/mLh), consumo de sustrato ($r_{s\ máx,}$ g/Lh), producción de etanol ($r_{p\ máx,}$ g/Lh) y el porcentaje alcohol volumen (v/v%).

12.3.4.1. Parámetros cinéticos en jugo de *A. angustifolia*

En jugo de *A. angustifolia* la cepa SLPA presentó un mayor rendimiento en la producción de biomasa, siendo un 27% superior en comparación con las demás cepas. En el rendimiento de la producción de etanol sobre sustrato consumido las ocho cepas mostraron rendimientos muy cercanos. Sin embargo, la cepa que se distingue es la SLPA.

La cepa OFF1 mostró una mayor velocidad de formación celular, siendo un 49% superior en comparación con las demás cepas. La velocidad de consumo de sustrato la cepa MC4 fue mayor en un 21% respecto a las demás cepas.

En la velocidad de producción de etanol la cepa que se distinguió del resto fue la DI1 alcanzando una velocidad 18% superior al resto de las demás cepas. También la cepa DI1 es la que mostró un alto porcentaje de alcohol.

Cuadro 12.3.4.1. Parámetros cinéticos de las cepas "mezcaleras" en jugo de *Agave angustifolia*

Levadura	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$r_{x\ máx}$ (cel/mLh)	$r_{s\ máx}$ (g/Lh)	$r_{p\ máx}$ (g/Lh)	v/v%
AR5 (*S. cerevisiae*)	$0.015_{\pm 0.003}$	$0.445_{\pm 0.013}$	$5.25x10^{6}{}_{\pm 1.68x10^{6}}$	$2.64_{\pm 0.23}$	$1.26_{\pm 0.005}$	$6.80_{\pm 0.26}$
MC4 (*S. cerevisiae*)	$0.014_{\pm 0}$	$0.434_{\pm 0.006}$	$4.96x10^{6}{}_{\pm 0.017x10^{6}}$	$4.94_{\pm 0.37}$	$1.25_{\pm 0.065}$	$7.24_{\pm 0.13}$
ZAC1(*S. cerevisiae*)	$0.004_{\pm 0}$	$0.459_{\pm 0.030}$	$2.71x10^{6}{}_{\pm 0.028x10^{6}}$	$1.22_{\pm 0.08}$	$0.67_{\pm 0.003}$	$3.70_{\pm 0.01}$
OFF1 (*K. marxianus*)	$0.019_{\pm 0.006}$	$0.497_{\pm 0.056}$	$37.6x10^{6}{}_{\pm 5.65x10^{6}}$	$4.43_{\pm 0.24}$	$1.76_{\pm 0.050}$	$7.76_{\pm 0.82}$
SLP1(*K. marxianus*)	$0.015_{\pm 0.001}$	$0.436_{\pm 0.016}$	$13.9x10^{6}{}_{\pm 1.58x10^{6}}$	$2.57_{\pm 0.003}$	$1.29_{\pm 0.067}$	$7.03_{\pm 0.12}$
SLPA(*C. ethanolica*)	$0.039_{\pm 0.01}$	$0.526_{\pm 0.031}$	$1.49x10^{6}{}_{\pm 0.445x10^{6}}$	$1.45_{\pm 0.05}$	$1.25_{\pm 0.120}$	$5.25_{\pm 0.24}$
DI1 (*T. delbrueckii*)	$0.014_{\pm 0.010}$	$0.499_{\pm 0.039}$	$4.94x10^{6}{}_{\pm 0.266x10^{6}}$	$3.18_{\pm 0.12}$	$1.91_{\pm 0.202}$	$8.02_{\pm 0.45}$
DGOP(*Z .bisporus*)	$0.022_{\pm 0.002}$	$0.476_{\pm 0.033}$	$6.57x10^{6}{}_{\pm 0.927x10^{6}}$	$2.86_{\pm 0.41}$	$1.40_{\pm 0.042}$	$6.58_{\pm 0.10}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Se observó que las cepas nativas del estado de Oaxaca (MC4 y DI1) que es el lugar donde se utiliza como materia prima *A. angustifolia* presentan buenos rendimientos en el consumo de sustrato (MC4), y buenos rendimientos en la producción de etanol y el porcentaje de alcohol volumen (DI1). No obstante se observó que también cepas no endémicas de esta región producen buenos rendimientos en la producción de etanol, población celular y en el consumo de sustrato, como es el caso de la cepa *K. marxianus* (OFF1) que fue asilada en el estado de Guerrero (cuadro 12.3.4.1.).

12.3.4.2. Parámetros cinéticos en jugo de *A. cupreata*

En jugo de *A. cupreata* la cepa SLPA exhibió un mayor rendimiento en la producción de biomasa sobre sustrato consumido, siendo un 19% más elevado en comparación con las demás cepas. En el rendimiento de producción de etanol sobre sustrato consumido, la cepa ZAC1 tuvo un 16% más que las demás cepas de levadura. También con esta cepa se presentó la mayor velocidad de producción celular y el mayor porcentaje alcohol volumen. Siendo estos superiores en comparación con el resto de las cepas en un 23% y 16% respectivamente. En la velocidad de consumo de sustrato las cepas que se distinguieron del resto fueron la AR5 y la MC4 en un 16%. Finalmente la cepa que presentó una velocidad mayor de producción de etanol fue la cepa OFF1. No obstante, la cepa ZAC1 también presentó velocidades elevadas en la producción de etanol.

Cuadro 12.3.4.2. Parámetros cinéticos de las cepas "mezcaleras" en jugo de *Agave cupreata*

Levadura	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$r_{x\ máx}$ (cel/mLh)	$r_{s\ máx}$ (g/Lh)	$r_{p\ máx}$ (g/Lh)	v/v%
AR5 (*S. cerevisiae*)	$0.022_{\pm 0}$	$0.332_{\pm 0.03}$	$14.5x10^6 \pm 1.76x10^6$	7.77 ± 0.386	$2.45_{\pm 0.04}$	$5.64_{\pm 0.13}$
MC4 (*S. cerevisiae*)	$0.003_{\pm 0}$	$0.270_{\pm 0.07}$	$8.32x10^6 \pm 0.208x10^6$	7.48 ± 0.442	$2.94_{\pm 0.93}$	$4.61_{\pm 1.14}$
ZAC1 (*S. cerevisiae*)	$0.026_{\pm 0.01}$	$0.431_{\pm 0}$	$12.9x10^6 \pm 6.41x10^6$	6.60 ± 0.081	$3.03_{\pm 0.22}$	$7.32_{\pm 0.13}$
OFF1 (*K. marxianus*)	$0.017_{\pm 0}$	$0.406_{\pm 0}$	$9.78x10^6 \pm 4.09x10^6$	5.26 ± 0.336	$3.19_{\pm 0.11}$	$6.93_{\pm 0.04}$
SLP1 (*K. marxianus*)	$0.018_{\pm 0}$	$0.346_{\pm 0.05}$	$8.13x10^6 \pm 3.15x10^6$	5.95 ± 0.171	$2.72_{\pm 0.47}$	$5.83_{\pm 0.78}$
SLPA (*C. ethanolica*)	$0.029_{\pm 0}$	$0.374_{\pm 0.04}$	$3.49x10^6 \pm 1.14x10^6$	1.58 ± 0.008	$1.14_{\pm 0.05}$	$4.70_{\pm 0.54}$
DI1 (*T. delbrueckii*)	$0.018_{\pm 0}$	$0.285_{\pm 0.10}$	$10.4x10^6 \pm 2.68x10^6$	7.27 ± 0.172	$2.24_{\pm 0.19}$	$4.87_{\pm 1.21}$
DGOP (*Z. bisporus*)	$0.017_{\pm 0}$	$0.307_{\pm 0}$	$1.74x10^6 \pm 5.89x10^6$	5.52 ± 0.552	$1.53_{\pm 0.13}$	$4.84_{\pm 0.37}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Por lo tanto, podemos observar que a pesar de que la cepa nativa (OFF1) del estado de Guerrero, región donde se produce mezcal utilizando como materia prima el *A. cupreata* presentó velocidades elevadas en la producción de etanol, la cepa ZAC1 nativa del estado de Zacatecas se adaptó positivamente a este jugo mostrando rendimientos elevados en la producción celular y en la producción de etanol (cuadro 12.3.4.2.).

12.3.4.3. Parámetros cinéticos en jugo de *A. durangensis*

En jugo de *A. durangensis* la cepa SLPA mostró una velocidad mayor en la producción de biomasa. Siendo un 26% más elevada en comparación con las demás cepas. También esta cepa presentó una velocidad en la producción celular más elevada. Siendo un 30% mayor.

En el rendimiento en la producción de etanol y el porcentaje alcohol volumen la cepa SLP1 se destacó del resto en un 43%. En la velocidad de consumo de sustrato la cepa DI1 se distinguió del resto de las cepas en un 34%. En la velocidad de producción de etanol la cepa OFF1 exhibió un rendimiento del 44%.

Cuadro 12.3.4.3. Parámetros cinéticos de las cepas "mezcaleras" en jugo de *Agave durangensis*

Levadura	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$r_{x\ máx}$ (cel/mLh)	$r_{s\ máx}$ (g/Lh)	$r_{p\ máx}$ (g/Lh)	v/v%
AR5 (*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
MC4 (*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ZAC1(*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
OFF1 (*K. marxianus*)	$0.029_{\pm0.01}$	$0.305_{\pm0.01}$	$2.42x10^{6}{}_{\pm0.081x10^{6}}$	$1.99_{\pm0.0132}$	$1.19_{\pm0.30}$	$4.82_{\pm0.19}$
SLP1(*K. marxianus*)	$0.034_{\pm0.01}$	$0.384_{\pm0.01}$	$2.91x10^{6}{}_{\pm1.17x10^{6}}$	$2.22_{\pm0.225}$	$0.906_{\pm0.016}$	$4.97_{\pm0.77}$
SLPA(*C. ethanolica*)	$0.042_{\pm0}$	$0.182_{\pm0.01}$	$3.48x10^{6}{}_{\pm4.55x10^{6}}$	$1.75_{\pm0.016}$	$0.550_{\pm0.203}$	$1.61_{\pm0.09}$
DI1 (*T. delbrueckii*)	$0.027_{\pm0.01}$	$0.005_{\pm0}$	$1.95x10^{6}{}_{\pm0.402x10^{6}}$	$4.86_{\pm0.456}$	$0.092_{\pm0.1106}$	$0.07_{\pm0.05}$
DGOP(*Z. bisporus*)	$0.015_{\pm0.06}$	$0.009_{\pm0}$	$0.718x10^{6}{}_{\pm0.510x10^{6}}$	$1.94_{\pm0.034}$	$0.004_{\pm0.001}$	$0.04_{\pm0.01}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Se observó que la cepa DGOP que es endémica del estado de Durango al igual que el *A. durangensis*, no mostró un desempeño positivo en la fermentación, limitándose solamente a crecer. Sin embargo, las dos cepas *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) mostraron altos rendimientos en la producción de celular y de etanol (cuadro 12.3.4.3.).

12.3.4.4. Parámetros cinéticos en jugo de *A. salmiana*

En jugo de *A. salmiana* la cepa DGOP mostró un mayor rendimiento en la producción de biomasa, siendo este un 37% superior al resto de las cepas. Sin embargo, son las dos cepas *K. marxianus* (OFF1, SLP1) se destacaron mostrando altos rendimientos en la producción de etanol sobre sustrato consumido, en las velocidades de producción celular, etanol y sustrato consumido, al igual que el porcentaje alcohol volumen.

La cepa SLP1 que es una cepa nativa del estado de San Luis Potosí, lugar donde se utiliza como materia prima el *A. salmiana* para la producción de mezcal. Se observó que de acuerdo a los resultados obtenidos esta cepa se adaptó satisfactoriamente a este jugo. Sin embargo, la cepa SLPA que también es nativa del San Luis Potosí no se adaptó favorablemente a las condiciones del jugo (cuadro 12.3.4.4.).

Cuadro 12.3.4.4. Parámetros cinéticos de las cepas "mezcaleras" en jugo de *Agave salmiana.*

Levadura	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$r_{x\ máx}$ (cel/mLh)	$r_{s\ máx}$ (g/Lh)	$r_{p\ máx}$ (g/Lh)	v/v%
AR5 (*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
MC4 (*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ZAC1(*S. cerevisiae*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
OFF1 (*K. marxianus*)	$0.046_{\pm0.06}$	$0.624_{\pm0.01}$	$14.5x10^{6}{}_{\pm5.8x10^{6}}$	$3.68_{\pm0.104}$	$2.21_{\pm0.11}$	$6.31_{\pm0.16}$
SLP1(*K. marxianus*)	$0.072_{\pm0}$	$0.540_{\pm0.04}$	$7.8x10^{6}{}_{\pm0.454x10^{6}}$	$3.91_{\pm0.916}$	$1.78_{\pm0.15}$	$7.22_{\pm0.52}$
SLPA(*C. ethanolica*)	$0.043_{\pm0}$	$0.391_{\pm0.02}$	$3.0x10^{6}{}_{\pm1.7x10^{6}}$	$3.06_{\pm1.86}$	$1.48_{\pm0.02}$	$4.51_{\pm0.13}$
DI1 (*T. delbrueckii*)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
DGOP(*Z. bisporus*)	$0.094_{\pm0.01}$	$0.417_{\pm0.02}$	$8.2x10^{6}{}_{\pm0.994x10^{6}}$	$2.19_{\pm0.088}$	$1.19_{\pm0.12}$	$4.55_{\pm0.06}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

12.3.4.5. Parámetros cinéticos en jugo de *A. tequilana*

En jugo de *A. tequilana* la cepa DI1 mostró altos rendimientos en la producción de biomasa y la producción de etanol sobre sustrato consumido. Siendo estos un 39% y 18% mayor en comparación con las otras cepas.

La cepa AR5 presentó una velocidad de producción celular superior en un 18% al resto de las demás cepas. La cepa que se distinguió en consumir más rápido los azúcares fue la OFF1. Finalmente la cepa DI1 presentó una velocidad de producción de etanol y porcentaje alcohol volumen superior que el resto de las demás cepas en un 21% y 19% respectivamente.

Cuadro 12.3.4.5. Parámetros cinéticos de las cepas "mezcaleras" en jugo de *Agave tequilana.*

Levadura	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$r_{x\ máx}$ (cel/mLh)	$r_{s\ máx}$ (g/Lh)	$r_{p\ máx}$ (g/Lh)	v/v%
AR5 (*S. cerevisiae*)	$0.007_{\pm0}$	$0.512_{\pm0}$	$9.69x10^{6}{}_{\pm2.95x10^{6}}$	$7.49_{\pm0.038}$	$1.20_{\pm0.217}$	$7.2_{\pm0.21}$
MC4 (*S. cerevisiae*)	$0.012_{\pm0}$	$0.313_{\pm0}$	$10.1x10^{6}{}_{\pm1.97x10^{6}}$	$4.70_{\pm0.141}$	$1.16_{\pm0.912}$	$5.84_{\pm0.08}$
ZAC1(*S. cerevisiae*)	$0.005_{\pm0}$	$0.391_{\pm0.04}$	$7.35x10^{6}{}_{\pm0.231x10^{6}}$	$2.69_{\pm0.129}$	$0.853_{\pm0.006}$	$5.82_{\pm0.59}$
OFF1 (*K. marxianus*)	$0.003_{\pm0}$	$0.402_{\pm0.01}$	$3.58x10^{6}{}_{\pm0.435x10^{6}}$	$3.78_{\pm0.198}$	$1.05_{\pm0.056}$	$7.26_{\pm0.12}$
SLP1(*K. marxianus*)	$0.002_{\pm0}$	$0.438_{\pm0.02}$	$2.41x10^{6}{}_{\pm0.023x10^{6}}$	$2.28_{\pm0.207}$	$0.912_{\pm0.107}$	$5.46_{\pm0.09}$
SLPA(*C. ethanolica*)	$0.024_{\pm0}$	$0.431_{\pm0.04}$	$7.96x10^{6}{}_{\pm0.073x10^{6}}$	$0.785_{\pm0.012}$	$0.485_{\pm0.112}$	$1.76_{\pm0.16}$
DI1 (*T. delbrueckii*)	$0.014_{\pm0.01}$	$0.623_{\pm0.03}$	$18.7x10^{6}{}_{\pm1.06x10^{6}}$	$2.44_{\pm0.079}$	$1.24_{\pm0.108}$	$8.43_{\pm0.47}$
DGOP(*Z.bisporus*)	$0.015_{\pm0.01}$	$0.434_{\pm0.05}$	$10.5x10^{6}{}_{\pm0.408x10^{6}}$	$2.15_{\pm0.246}$	$0.994\pm_{0.293}$	$3.04_{\pm0.23}$

Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

Las dos cepas que fueron aisladas en jugo *A. tequilana* (AR5 y ZAC1) no se adaptaron tan favorablemente como lo hizo la cepa DI1 que es nativa de Oaxaca (cuadro 12.3.4.5.)

De los resultados obtenidos en las secciones anteriores, podemos observar que no necesariamente las cepas nativas de cada región tienen las mejores capacidades fermentativas en los jugos de las especies de *Agave* endémicas a la zona donde fueron aisladas.

También se observó que las cepas *K. marxianus* destacaron en cuanto a la velocidad de producción de etanol y rendimientos en los cinco jugos de agave utilizados para el presente estudio. Por lo tanto, comparando los resultados que se obtuvieron en este trabajo a los reportados en la literatura, podemos corroborar que las cepas de la especie *K. marxianus* se adaptan a diferentes medios para su fermentación, mostrando altas velocidades de crecimiento y de producción de etanol (Fonseca. 2008; Lane. 2010).

12.4. Compuestos volátiles

Para la cuantificación de los compuestos volátiles se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un *head space* (sección 11.5.3.). Para la cuantificación tanto de los compuestos volátiles como del etanol se realizó de manera directa, es decir, sin hacer ninguna dilución ni extracción. Al igual que el etanol se siguió la cinética de producción de los demás compuestos volátiles en un periodo de 72 horas (anexo 4).

12.4.1. Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores que se cuantificaron fueron el 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, y alcoholes amílicos, sin embargo, no se detectó la presencia de 1-butanol en los cinco jugos fermentados con las ocho cepas de levadura.

12.4.1.1. Producción de 1-propanol

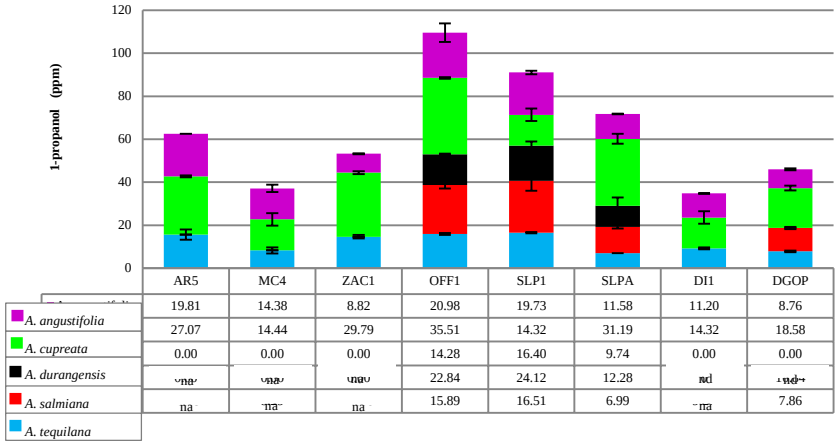
En la grafica 12.4.1.1. se observa la evolución de la concentración de 1-propanol transcurridas las 72 horas del tiempo de fermentación en los cinco jugos de agave, teniendo como resultado que es en jugo de *A. cupreata* donde las cepas AR5, ZAC1, OFF1, SLPA, DI1 y DGOP produjeron las concentraciones más elevadas de este compuesto.

En jugo de *A. salmiana* la cepa SLP1 produjo la concentración más elevada de 1-propanol.

En jugo de *A. durangensis*, no se detectó la presencia de 1-propanol al fermentar con la *Z. bisporus* (DGOP) a pesar de que si se fermentó con esta cepa.

La formación de los alcoholes superiores depende de ciertos aminoácidos presentes en el jugo de agave y/o del nitrógeno presente en el jugo. En el caso del 1-propanol su precursor es la treonina o metionina (Arrizon. 2001), por lo que podemos suponer que en jugo de *A. cupreata* puede tener altas concentraciones de estos aminoácidos.

Grafica 12.4.1.1. Concentración de 1-propanol (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	19.81	14.38	8.82	20.98	19.73	11.58	11.20	8.76
A. cupreata	27.07	14.44	29.79	35.51	14.32	31.19	14.32	18.58
A. durangensis	0.00	0.00	0.00	14.28	16.40	9.74	0.00	0.00
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	22.84	24.12	12.28	nd	[illegible]
A. salmiana	na	na	na	15.89	16.51	6.99	na	7.86
A. tequilana								

na=no analizado, nd= no detectado

En el análisis de varianza se demostró que no existen diferencias estadísticas significativas entre los jugos de *A. angustifolia* y *A. tequilana* para la producción de 1-propanol. Tampoco existen diferencias estadísticas entre los jugos de *A. durangensis* y *A. salmiana*.

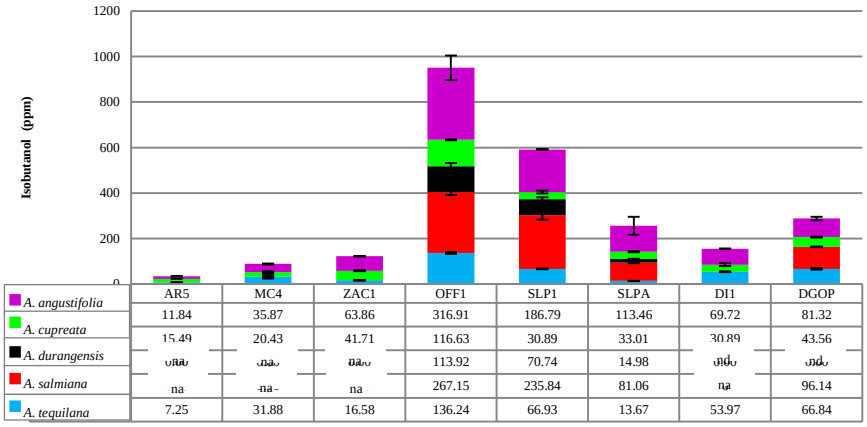
Además de acuerdo con el análisis de varianza no existieron diferencias estadísticas significativas entre las dos cepas *K. marxianus* para la producción de 1-propanol. No obstante si existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas del género *Saccharomyces* (anexo 5).

Finalmente se observó que las dos cepas *K. marxianus* superan a las *S. cerevisiae* en la producción de este compuesto en los cinco jugos de agave.

12.4.1.2. Producción de isobutanol

En la grafica 12.4.1.2 se observa la concentración de isobutanol transcurridas las 72 horas de fermentación. Teniendo como resultado que en jugo de *A. angustifolia* las cepas MC4, ZAC1, OFF1, SLPA, DI1 produjeron altas concentraciones de este compuesto. En jugo de *A. cupreata* la cepa AR5 presentó altas concentraciones de isobutanol. En jugo de *A. salmiana* las cepas que mostraron altas concentraciones de este compuesto son las cepas SLP1 y DGOP.

Grafica 12.4.1.2. Concentración de isobutanol (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	11.84	35.87	63.86	316.91	186.79	113.46	69.72	81.32
A. cupreata	15.49	20.43	41.71	116.63	30.89	33.01	30.89	43.56
A. durangensis	nd	nd	nd	113.92	70.74	14.98	nd	nd
A. salmiana	na	na	na	267.15	235.84	81.06	na	96.14
A. tequilana	7.25	31.88	16.58	136.24	66.93	13.67	53.97	66.84

na=no analizado, nd= no detectado

En el caso de la producción del isobutanol, su aminoácido precursor es la valina (Arrizon. 2001), por lo que se puede elucidar que probablemente este aminoácido esté presente en los jugos de *A. angustifolia*, *A. cupreata* y *A. salmiana*.

En jugo de *A. salmiana* y *A. durangensis* no se detectó la presencia de isobutanol al fermentar con la cepa de la especie *T. delbrueckii* (DI1). Tampoco no se detectó este compuesto al fermentar en jugo de *A. durangensis* con la cepa *Z. bisporus* (DGOP).

Finalmente se observó que las dos cepas de la especie *K. marxianus* (OFF1 y SLP1) se distinguen del resto de las levaduras en la producción de este compuesto en los cinco jugos de agave. Siendo la cepa OFF1 la que destaca entre ellas (anexo 4).

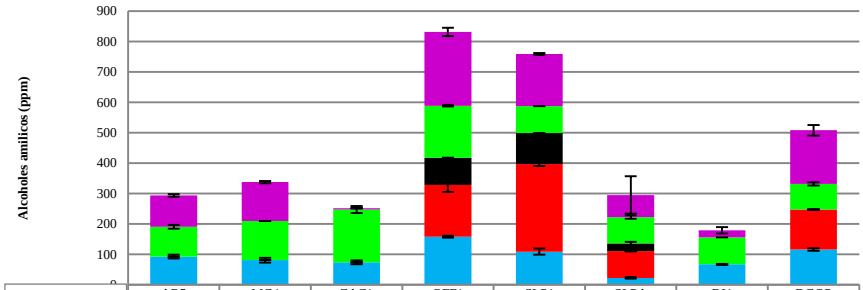
En el análisis de varianza se tiene como resultados que no existieron diferencias estadísticas significativas entre los jugos de *A. angustifolia* y *A. salmiana*, *A. cupreata* y *A. durangensis*, *A. cupreata* y *A. tequilana A. durangensis* y *A. tequilana.*

Se observa que no existieron diferencias significativas entre las cepas del género *Saccharomyces*. No obstante, si existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas de la especie *K. marxianus* para la producción de isobutanol (anexo 5).

12.4.1.3. Producción de alcoholes amílicos

En la producción de alcoholes amílicos se producen altas concentraciones en los cinco jugos al fermentar con las dos cepas *K. marxianus* (grafica 12.4.1.3).

Gráfica 12.4.1.3. Concentración de alcoholes amílicos (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	102.77	128.07	4.20	242.67	171.79	72.56	23.01	176.33
A. cupreata	98.06	128.78	173.48	170.36	88.76	86.87	88.76	84.23
A. durangensis	[illegible]	[illegible]	[illegible]	90.06	101.43	24.64	[illegible]	[illegible]
A. salmiana	[illegible]	[illegible]	[illegible]	170.22	287.83	88.14	na	131.22
A. tequilana	92.90	80.87	74.17	157.95	109.20	22.92	67.63	116.29

na=no analizado, nd= no detectado

Se observó que independientemente del tipo de jugo en el que se fermentó, las levaduras tienen comportamientos muy diferentes en la producción de este compuesto aun siendo cepas del mismo género. En jugo de *A. angustifolia* y *A. tequilana* la cepa OFF1 es la que mostró altas concentraciones de alcoholes amílicos. En jugo de *A. durangensis* y *A. salmiana* la cepa SLP1 es la que se destacó del resto de las cepas. Finalmente en jugo de *A. cupreata* la cepa ZAC1 es la que produjo altas concentraciones de estos compuestos (gráfica 12.4.1.3.).

Los aminoácidos precursores para la formación de los alcoholes amílicos son la leucina e isoleucina (Arrizon. 2001), por lo que posiblemente las rutas catabólicas y anabólicas de estos aminoácidos sean escenciales para el crecimiento y fermentación por las levaduras en este jugo de agave.

Finalmente al igual que con la producción de 1-propanol e isobutanol, no se detectó la presencia de los alcoholes amílicos al fermentar con las cepas DI1 en jugo de *A. durangensis* y *A. salmiana.* Además en jugo de *A. durangensis* no se detectó al fermentar con la cepa DGOP (anexo 4).

De acuerdo con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre los jugos *A. angustifolia, A. cupreata, A. salmiana, A. tequilana* y el jugo *A. durangensis* (anexo 5), se concluye de acuerdo a los análisis estadísticos que la formación de alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol, alcoholes amílicos) es influenciada tanto por la especie de *Agave* como por la especie de levadura presente en la etapa de fermentación. Observándose que en los jugos de *A. cupreata y A. angustifolia* fue donde se produjeron las mayores concentraciones de estos compuestos. Esto puede atribuirse a que los jugos de estas especies de agave tienen las mayores concentraciones de nitrógeno orgánico (aminoácidos), confirmando que la presencia de aminoácidos en el medio ocasiona la alta producción de alcoholes superiores por la levadura.

Hernández y col. en el 2002 estudiaron la relación entre los diferentes tipos de aminoácidos presentes en el mosto de uva y el perfil sensorial de la bebida. Encontraron que la treonina influye en la proporción de alcoholes superiores en el vino, mientras existía una alta concentración de este compuesto en el mosto, mayor fueron las proporciones de alcohol isoamílico y β-feniletanol, y menor fue la proporción de isobutanol. También relacionaron la fenilalanina a la producción de alcoholes superiores, encontrando que mientras más alta es la concentración de este aminoácido mayor fue la concentración de β-feniletanol e isobutanol y menor fue la concentración de alcohol isoamilico (Hernández. 2002).

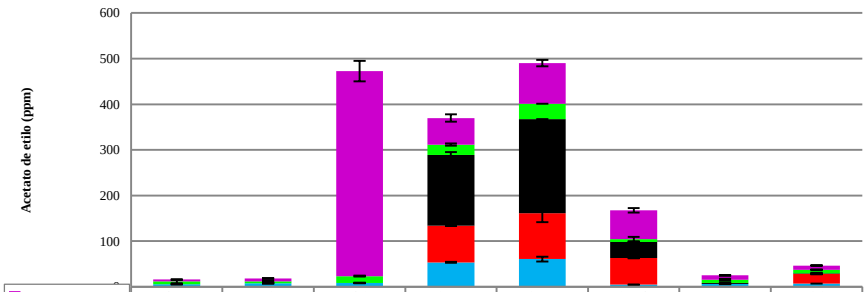
Además las cepas de la especie *K. marxianus* fueron las cepas que produjeron las concentraciones más elevadas de estos compuestos en los diferentes jugos de agave, concluyendo que estas cepas fueron la que mejor se adaptaron a las condiciones de cada jugo.

12.4.2. Esteres

Se cuantificó acetato de etilo, lactato de etilo, caproato etilo y caprato de etilo. Sin embargo, no se detectó la presencia de estos tres últimos compuestos en ninguna de las fermentaciones realizadas.

En la gráfica 12.4.2.1. se muestran los resultados obtenidos de la producción de acetato de etilo transcurridas 72 horas de fermentación. Se observó que existen diferencias en la producción de este compuesto aun siendo cepas del mismo género.

Gráfica 12.4.2.1. Concentración de acetato de etilo (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	4.40	6.47	449.12	58.12	88.85	63.14	9.41	8.87
A. cupreata	6.20	4.31	15.13	22.72	34.01	5.87	6.73	7.87
A. durangensis	[illegible]	[illegible]	[illegible]	155.03	205.93	35.56	2.57	1.53
A. salmiana	[illegible]	[illegible]	[illegible]	80.32	100.71	58.38	nd	21.24
A. tequilana	5.43	7.72	8.37	53.65	60.82	4.63	6.25	6.92

na=no analizado, nd= no detectado

En jugo de *A. angustifolia* la cepa ZAC1 es la que se distingue del resto de las demás cepas, y además es la que produjo una mayor concentración que en todos los demás jugos. También en jugo de *A. durangensis* las cepas OFF1 y SLP1 son las que mostraron las más altas concentraciones de este compuesto (gráfica 12.4.2.1).

En el análisis estadístico se obtuvo que existen diferencias estadísticas significativas entre los jugos de *A. angustifolia* y *A. cupreata, A. angustifolia* y *A. tequilana, A. cupreata* y *A. durangensis, A. durangensis* y *A. tequilana.*

Además se observaron diferencias estadísticas significativas entre las cepas del género *Saccharomyces* para la producción de acetato de etilo. No obstante, no existen diferencias estadísticas entre las cepas del género *Kluyveromyces* (anexo 5).

Por lo tanto, se concluye que la producción de este compuesto es influenciada tanto por la especie de levadura así como de la especie de agave. Al igual que con los alcoholes superiores existe una estrecha relación entre la producción de esteres y el nitrógeno orgánico presente en el medio. En la literatura se reporta que los niveles elevados de treonina están fuertemente relacionados con la producción de acetato de etilo. Mientras más alta sea la concentración de este aminoácido en el medio, mayor será la concentración de acetato de etilo en el producto terminado (Hernández. 2002). Por lo que podemos suponer que tanto el jugo de *A. angustifolia* como el *A. durangensis* existe la presencia de este aminoácido. Además, en la literatura se reporta que las levaduras presentan diferente demanda de nitrógeno aun siendo cepas de la misma especie (Manginot. 1998). Por lo que es posible que las dos cepas de la especie de *K. marxianus* y la cepa *S. cerevisiae* asimilaron mejor la treonina presente en jugo de *A. angustifolia* y *A. durangensis* para la producción de acetato de etilo.

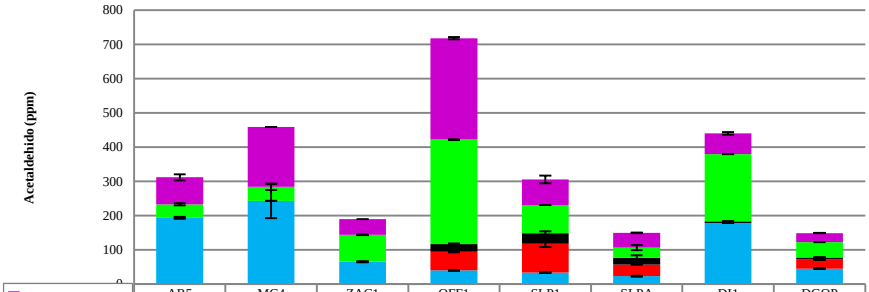
12.4.3. Carbonilos (acetaldehído)

En la gráfica 12.4.3.1. se muestran las concentraciones de acetaldehído transcurridas 72 horas de fermentación. Se observó que al igual que los alcoholes superiores y los ésteres, la formación de acetaldehído es influenciada por el tipo de materia prima y la especie de levadura presente en la etapa de fermentación.

Teniendo como resultado que en jugo de *A. angustifolia* y *A. cupreata* la cepa OFF1 es la que produjo altas concentraciones de este compuesto. En jugo de *A. durangensis* y *A. salmiana* la cepa SLP1 es la que se destacó en producir altas concentraciones de este compuesto. Finalmente

en jugo de *A. tequilana* la cepa MC4 es la que mostró altas concentraciones de acetaldehído (anexo 4).

Gráfica 12.4.3.1. Concentración de acetaldehído (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	79.07	175.30	46.15	296.03	74.95	42.98	60.72	26.87
A. cupreata	39.59	41.06	78.36	305.26	82.05	30.00	196.82	44.38
A. durangensis	[illegible]	[illegible]	[illegible]	23.08	30.49	19.28	4.18	5.94
A. salmiana	[illegible]	[illegible]	[illegible]	54.23	84.23	34.09	na	26.63
A. tequilana	193.54	242.70	65.31	39.84	33.73	23.24	178.77	45.19

na=no analizado

En el análisis de varianza podemos observar que existen diferencias estadísticas significativas entre los jugos de agave con el jugo de *A. durangensis.* Además existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas del género *Kluyveromyces* para la producción de acetaldehído (anexo 5).

En las secciones anteriores se mostró que las cepas *K. marxianus* produjeron altas concentraciones de alcoholes superiores, acetato de etilo, y acetaldehído, dependiendo del tipo de sustrato con el que se fermentó. Medeiros y col. en 2000, estudiaron el comportamiento de la cepa *K. marxianus* al realizar fermentaciones en fase sólida en diferentes sustratos, encontrando que esta cepa produce altas concentraciones de acetato de etilo, etanol y acetaldehído dependiendo del tipo de sustrato con el que se fermente (Medeiros. 2000).Por lo tanto, podemos concluir que en el caso particular de la cepa *K. marxianus* la producción de volátiles se verá afectada por el tipo de sustrato con el cual se fermente.

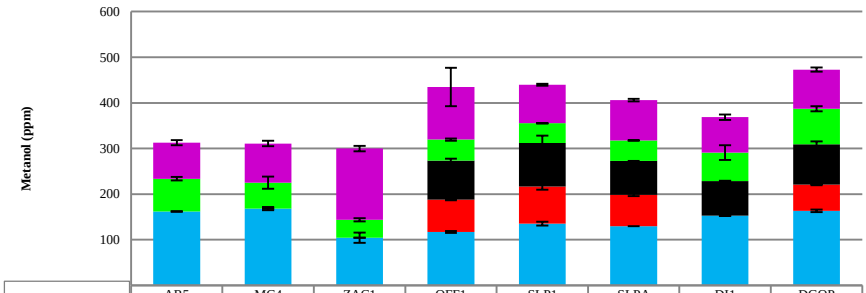
12.4.4. Metanol

La producción de metanol no es propia de la fermentación sino más bien de la etapa del cocimiento (sección 10.4). Sin embargo, algunos autores mencionan que algunas cepas de

levadura pueden tener la enzima pectin-metil-esterasa que puede ocasionar la hidrólisis de las pectinas presentes en el jugo de agave ocasionando así que varíe la concentración de metanol presente de una cepa a otra.

En la gráfica 12.4.4.1. podemos observar que la concentración de metanol no varía de una cepa a otra siendo el jugo de *A. tequilana* el que presenta una mayor concentración de metanol. Es necesario aclarar, que los jugos de *A. durangensis* y *A. salmiana* no fueron analizados después de 72h con las levaduras *S. cerevisiae* debido a que estas cepas no fermentaron estos jugos de agave y es la razón por lo que se indica que no se detectó, pero muy probablemente tiene la misma concentración que el fermentado con las otras levaduras.

Gráfica 12.4.4.1. Concentración de metanol (72 horas)



	AR5	MC4	ZAC1	OFF1	SLP1	SLPA	DI1	DGOP
A. angustifolia	79.17	85.87	155.80	115.20	84.36	88.13	77.86	85.98
A. cupreata	71.35	56.78	39.27	46.16	43.40	45.11	62.13	77.50
A. durangensis	nd	nd	nd	85.61	95.66	74.24	75.50	88.58
A. salmiana	nd	nd	nd	70.51	80.87	68.69	na	57.47
A. tequilana	162.36	168.37	104.84	117.27	135.59	129.69	153.18	163.44

na=no analizado, nd= no detectado

Realizando el análisis estadístico se comprobó que si existen diferencias estadísticas significativas entre los diferentes jugos de agave, y entre las cepas no existen diferencias estadísticas significativas, confirmando así que la producción de metanol se ve influenciada por la especie de *Agave* (anexo 5).

Además del metanol, los furfurales se producen en la etapa de cocimiento, en el presente trabajo se cuantificó el 2-furfuraldehído y el 5-hidroxi 2- furfuraldehido. No se detectó la presencia de estos compuestos en los diferentes jugos de agave.

12.4.5 Terpenos

En la sección 12.1.3. se mencionaron los terpenos presentes en los diferentes jugos de agave cocidos sin fermentar, en esta sección se describirá el comportamiento de estos terpenos una vez fermentados en los diferentes jugos con las cepas.

La metodología que se empleo para detectar y cuantificar estos terpenos es una microextracción acoplada a cromatografía de gases (sección 11.2.2.). Es importante mencionar que sólo se analizó el comportamiento de cada jugo con las cepas de una sola especie de esta forma solo se utilizaron con las cepas AR5 (*S. cerevisiae*), OFF1 (*K. marxianus*), SLPA (*C. ethanolica*), DI1 (*T. delbrueckii*), DGOP (*Z. bisporus*). Además solo se identificaron los terpenos presentes al final de la fermentación, es decir, transcurridas 72 horas.

Los compuestos que se analizaron fueron: limoneno, p-cimeno, linalool, 4-terpineol, α-terpineol, citronelol, nerol y geraniol.

12.4.5.1. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. angustifolia*

En el jugo de *A. angustifolia* no se mostró la presencia de limoneno al fermentar con AR5, OFF1, SLPA y DI1. Sin embargo, existió un aumento en su concentración al fermentar con la cepa DGOP. El p-cimeno y el 4-terpineol no se detectaron al fermentar con las cepas AR5, DI1, DGOP y SLPA este jugo, no obstante con la cepa OFF1 se observaron concentraciones por debajo de 0.0046ppm y de 0.0092 respectivamente. Durante el análisis cromatográfico se encontraron picos al fermentar con las cepas AR5, DI1, DGOP, SLPA en el tiempo de retención del linalool, sin embargo, la concentración obtenida fue menor a la concentración más baja de cuantificación (0.0210ppm), por lo que no fue posible determinar la cantidad presente, mientras que con la cepa OFF1 no se detectó ningún pico en el tiempo de retención del linalool.

El α-terpineol en el jugo *A. angustifolia* cocido sin fermentar presenta altas concentraciones. Sin embargo, una vez fermentado con las cepas AR5, DI1 DGOP y SLPA presentó concentraciones por debajo de las 0.046ppm y con la cepa OFF1 mostró una concentración de 0.0165ppm.

No se detectó citronelol en el jugo cocido sin fermentar, ni en el jugo fermentado con las cepas DI1, OFF1, DGOP y SLPA. Sin embargo, con la cepa AR5 mostró una concentración de 0.011ppm.

El nerol no se detectó en el jugo sin fermentar, ni en el jugo fermentado con las diferentes cepas.

El geraniol no se detectó al fermentar con las cepas DI1, OFF1, DGOP y SLPA. Sin embargo, se observó una ligera producción con la cepa AR5 al presentar una concentración de 0.037ppm (cuatro 12.4.5.1.).

Cuadro 12.4.5.1. Concentración de terpenos en jugo de *A. angustifolia* cocido y fermentado.

Compuesto	***A. angustifolia*** **(ppm)**	**AR5** ***S. cerevisiae*** **(ppm)**	**OFF1** ***K. marxianus*** **(ppm)**	**SLPA** ***C. ethanolica*** **(ppm)**	**DI1** ***T. delbrueckii*** **(ppm)**	**DGOP** ***Z. bisporus*** **(ppm)**
limoneno	$0.017_{\pm 0.001}$	Nd	Nd	Nd	Nd	$0.0231_{\pm 0.012}$
p-cimeno	$0.004_{\pm 0.0004}$	Nd	<0.0046	Nd	Nd	Nd
linalool	$0.059_{\pm 0.0038}$	<0.0210	Nd	<0.0210	<0.0210	<0.0210
4-terpineol	Nd	Nd	<0.0092	Nd	Nd	Nd
α-terpineol	$0.698_{\pm 0.0206}$	<0.0464	$0.0165_{\pm 0.002}$	<0.0464	<0.0464	<0.0464
citronelol	Nd	$0.0111_{\pm 0}$	Nd	Nd	Nd	Nd
nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
geraniol	$0.037_{\pm 0.0091}$	$0.0377_{\pm 0.007}$	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = No detectado. Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes.

12.4.5.2. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. cupreata*

En jugo de *A. cupreata* se observó una disminución en la concentración del limoneno al fermentar con las cepas AR5 y DGOP obteniendo una concentración de 0.014ppm y 0.146ppm respectivamente. En el resto de las cepas no se detectó la presencia de este compuesto.

El p-cimeno y el 4-terpineol no se presentaron al fermentar con las diferentes cepas en este jugo. Las concentraciones de linalool y el α-terpineol se encuentran por debajo de 0.021ppm y 0.046ppm respectivamente al fermentar con las diferentes cepas. El citronelol no se observó al fermentar con las cepas DI1, DGOP y SLPA. Sin embargo, aumentó su concentración al fermentar con las cepas AR5 y OFF1 presentando una concentración de 0.016ppm y 0.031ppm respectivamente. El nerol no se detectó en el jugo sin fermentar, ni en el jugo ya fermentado con

las diferentes cepas. Finalmente el geraniol no se detectó al fermentar con las cepas DI1, OFF1, DGOP y SLPA, mientras que con la cepa AR5 disminuye su concentración a 0.044ppm (cuadro 12.4.5.2.).

Cuadro 12.4.5.2. Concentración de terpenos en jugo de *A. cupreata* cocido y fermentado.

Compuesto	*A. cupreata* (ppm)	AR5 *S. cerevisiae* (ppm)	OFF1 *K. marxianus* (ppm)	SLPA *C. ethanolica* (ppm)	DI1 *T. delbrueckii* (ppm)	DGOP *Z. bisporus* (ppm)
Limoneno	$0.743_{\pm 0.487}$	$0.0140_{\pm 0.0006}$	Nd	Nd	Nd	$0.146_{\pm 0}$
p-cimeno	$0.023_{\pm 0.008}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Linalool	$0.041_{\pm 0.001}$	<0.0210	<0.0210	<0.0210	<0.0210	<0.0210
4-terpineol	$0.009_{\pm 0}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
α-terpineol	$1.269_{\pm 0.004}$	<0.0464	<0.0464	<0.0464	<0.0464	<0.0464
Citronelol	$0.011_{\pm 0}$	$0.0162_{\pm 0.001}$	$0.0311_{\pm 0.001}$	Nd	Nd	Nd
Nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Geraniol	$0.053_{\pm 0}$	$0.0445_{\pm 0.0055}$	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = No detectado. Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes

12.4.5.3. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. durangensis*

En jugo de *A. durangensis* el limoneno y el α-terpineol presentaron una disminución en su concentración al fermentar con las diferentes cepas.

No se detectó la presencia de p-cimeno, 4-terpienol y el geraniol al fermentar con las diferentes cepas. La concentración de linalool estuvo por debajo de las 0.0210ppm con todas las cepas. El citronelol y el nerol no se observó en el jugo cocido, ni en el jugo ya fermentado (cuadro 12.4.5.3).

Cuadro 12.4.5.3. Concentración de terpenos en jugo de *A. durangensis* cocido y fermentado.

Compuesto	*A. durangensis* (ppm)	AR5 *S. cerevisiae* (ppm)	OFF1 *K. marxianus* (ppm)	SLPA *C. ethanolica* (ppm)	DI1 *T. delbrueckii* (ppm)	DGOP *Z. bisporus* (ppm)
Limoneno	$0.021_{\pm 0.001}$	Nd	0.0150±0	$0.0144_{\pm 0}$	$0.0156_{\pm 0.002}$	$0.0140_{\pm 0.001}$
p-cimeno	$0.002_{\pm 0}$	Nd	Nd	Nd	$0.002_{\pm 0}$	$0.0026_{\pm 0.002}$
Linalool	$0.068_{\pm 0.008}$	Nd	<0.0210	<0.0210	<0.0210	<0.0210
4-terpineol	$0.016_{\pm 0.002}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
α-terpineol	$1.671_{\pm 0.170}$	Nd	$0.2042_{\pm 0.008}$	$0.4673_{\pm 0.0123}$	$0.3100_{\pm 0}$	$0.1757_{\pm 0.68}$
Citronelol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Geraniol	$0.033_{\pm 0.002}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = No detectado. Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes

12.4.5.4. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. salmiana*

En jugo de *A. salmiana* no se detectó limoneno al fermentar con SLPA y se mantuvo su concentración al fermentar con OFF1 y DGOP. El p-cimeno y 4-terpineol no se observaron al fermentar con las diferentes cepas.

El α-terpineol, citronelol y el nerol no se presentaron en el jugo cocido, ni en el jugo ya fermentado. El linalool no se detectó en jugo cocido, sin embargo, al fermentarse con las diferentes cepas presentó concentraciones por debajo de las 0.021ppm.

El geraniol no se observó en el jugo cocido y ni al fermentar con la cepa SLPA, sin embargo, mostró concentraciones de 0.022ppm al fermentar con OFF1 y de 0.024ppm al fermentar con DGOP (cuadro 12.4.5.4.).

Cuadro 12.4.5.4. Concentración de terpenos en jugo de *A. salmiana* cocido y fermentado.

Compuesto	***A. salmiana*** **(ppm)**	**AR5** ***S. cerevisiae*** **(ppm)**	**OFF1** ***K. marxianus*** **(ppm)**	**SLPA** ***C. ethanolica*** **(ppm)**	**DI1** ***T. delbrueckii*** **(ppm)**	**DGOP** ***Z. bisporus*** **(ppm)**
Limoneno	$0.014_{\pm 0.001}$	Nd	$0.014_{\pm 0}$	Nd	Nd	$0.014_{\pm 0}$
p-cimeno	$0.001_{\pm 0}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Linalool	Nd	Nd	<0.0210	<0.0210	Nd	<0.0210
4-terpineol	$0.002_{\pm 0}$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
α-terpineol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
citronelol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
geraniol	Nd	Nd	$0.0223_{\pm 0.001}$	Nd	Nd	$0.0239_{\pm 0.006}$

Nd = No detectado. Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes

12.4.5.5. Producción de terpenos al fermentar con jugo de *A. tequilana*

En jugo de *A. tequilana* el limoneno aumentó su concentración al fermentar con las cepas DGOP (0.148ppm) y AR5 (0.042ppm). No obstante disminuyó su concentración al fermentar con OFF1 y DI1 (0.014ppm), además, no se detectó al fermentar con la cepa SLPA. El p-cimeno no se observó al fermentar con AR5, OFF1, DI1 y DGOP, y disminuyó su concentración al fermentar con SLPA. El 4-terpienol no se detectó al fermentar con OFF1, SLPA, DI1 y DGOP, y disminuye su concentración al fermentar con AR5. El α-terpineol presentó concentración por

debajo de 0.046ppm al fermentar con AR5, OFF1. DI1 y DGOP, mientras que al fermentar con SLPA disminuyó su concentración a 0.194ppm. El citronelol no se detectó en el jugo cocido, ni en el fermentado. El nerol no se mostró en el jugo cocido, ni al fermentar con AR5, OFF1, SLPA y DI1. Sin embargo, presentó una concentración de 0.058ppm al fermentar con SLPA. Finalmente el geraniol aumentó su concentración al fermentar con AR5 (0.046ppm) y no se detectó al fermentar con OFF1, SLPA, DI1 y DGOP (cuadro 12.4.5.5)

Cuadro 12.4.5.5. Concentración de terpenos en jugo de *A. tequilana* cocido y fermentado.

Compuesto	***A. tequilana*** **(ppm)**	**AR5** ***S. cerevisiae*** **(ppm)**	**OFF1** ***K. marxianus*** **(ppm)**	**SLPA** ***C. ethanolica*** **(ppm)**	**DI1** ***T. delbrueckii*** **(ppm)**	**DGOP** ***Z. bisporus*** **(ppm)**
limoneno	$0.016_{\pm 0}$	$0.0415_{\pm 0}$	$0.0143_{\pm 0}$	Nd	$0.0144_{\pm 0}$	$0.148_{\pm 0}$
p-cimeno	$0.003_{\pm 0}$	Nd	Nd	$0.00214_{\pm 0}$	Nd	Nd
linalool	$0.023_{\pm 0.006}$	<0.0210	<0.0210	<0.0210	<0.0210	$0.0756_{\pm 0.15}$
4-terpineol	$0.016_{\pm 0.002}$	$0.0122_{\pm 0.002}$	Nd	Nd	Nd	Nd
α-terpineol	$1.331_{\pm 0.154}$	<0.0464	<0.0464	$0.194_{\pm 0.031}$	<0.0464	<0.0464
citronelol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Nerol	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	$0.0576_{\pm 0}$
geraniol	$0.029_{\pm 0.004}$	$0.0462_{\pm 0.006}$	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd = No detectado. Los subíndices marcan la desviación estándar de dos experimentos diferentes

Se observó que las levaduras tienen comportamientos diferentes al fermentar los diferentes jugos de agave, en la literatura se reporta que durante la fermentación para la producción de vino y cerveza las especies de levadura del género *S. cerevisiae* y la *T. delbrueckii* ayudan a la biotransformación de un monoterpeno a otro (King. 2000). Podemos observar que en la mayoría de los casos existe una disminución o la desaparición del compuesto que se había detectado en el jugo de agave sin fermentar y posteriormente se ve el aumento de algún compuesto una vez fermentado el jugo de agave, esta variación se puede deber a que existe esta biotransformación de un monoterpeno a otro al fermentar con estas levaduras los jugos de agave. No obstante el jugo de agave ya fermentado es mucho más complejo que el jugo cocido por lo que también esta variación se pueda deber al tipo de fibra empleada en la micro extracción por lo tanto se sugiere la optimización de la técnica para futuras investigaciones.

13. Conclusiones

Las especies de jugo de agave presentaron diferencias en su composición química, posiblemente estas diferencias ocasionaron que las cepas no se hayan adecuado a todos los jugos, siendo las cepas del género *S. cerevisiae* las que no se adaptaron a los jugos de *A. durangensis* y *A. salmiana*, además de la *T. delbrueckii* que no creció en jugo de *A. salmiana*.

En jugo de *A. durangensis* las cepas de la especie *C. ethanolica, T. delbrueckii* y *Z. bisporus* no se adaptaron a las condiciones nutricionales, por lo que existe una relación directa entre los nutrientes e inhibidores presentes en la materia prima a la adaptación de la levadura en la etapa de fermentación, debido a que este jugo es el que mostró una baja concentración de nitrógeno y altas concentraciones de saponinas.

Al evaluar las capacidades fermentativas de las diferentes cepas mezcaleras se observó que no necesariamente las cepas nativas de cada región se adaptan adecuadamente a las especies de *Agave* endémico a la zona donde fueron aisladas, teniendo que las cepas del género *K. marxianus* se adaptaron satisfactoriamente a los cinco jugos de agave utilizados para este estudio, generando altas concentraciones de etanol y manteniéndose a lo largo de la fermentación.

Finalmente en la producción de volátiles se obtuvo que la generación de alcoholes superiores, esteres, acetaldehído y terpenos se vio influenciada por la materia prima utilizada y la especie de levadura presente en la etapa de fermentación, solo la producción de metanol se ve influenciada por la especie de agave. Anteriormente se creía que las levaduras no-*Saccharomyces* le conferían notas desagradables al vino, además de que se observaba bajos rendimientos en la producción de etanol. Sin embargo, siguiendo las investigaciones de las últimas décadas, se ha revelado que en cultivos mixtos las levaduras no-*Saccharomyces* le confieren notas positivas al producto terminado, y por ende un aroma y composición más compleja. En este contexto la actividad enzimática de las no-*Saccharomyces* pueden influenciar en el perfil de las bebidas alcohólicas. Por lo tanto, existen características enológicas especificas en levaduras no-*Saccharomyces* que no están presentes en cepas de *S. cerevisiae* y que pueden tener efectos positivos en las bebidas.

14. Recomendaciones

En este trabajo sólo se estudiaron de manera general los compuestos químicos más representativos del agave de manera global, sin embargo es importante un estudio más detallado sobre la conformación de los nutrientes presentes en los diferentes jugos de agave tanto crudo como cocido para conocer como estos se ven afectados en la etapa de cocimiento.

Además sólo se estudiaron las capacidades fermentativas de las levaduras de manera individual, por lo que es necesario realizar fermentaciones con cultivos mixtos para ver el comportamiento de las cepas en los diferentes jugos de agave y de esta forma poder acercarse a lo que en realidad ocurre en la fermentación a nivel industrial. También profundizar en el estudio de las *K. marxianus* ya que al parecer juegan un papel muy importante en la producción de bebidas de agave.

Finalmente se sugiere hacer un análisis sensorial para ver como estas levaduras afectan a la conformación final de producto.

15. Referencias.

Alcázar., V., E. M., (2008). Estudio de la fermentación por lote alimentado para la proudcción de tequila 100% agave. Tlaquepaque, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente. **Licenciatura**.

Arrizon., G., J., (2001). Efecto de la concentración de azúcar y la adición de nitrógeno sobre el producto de fermentación del tequila. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías Guadalajara, Univerisidad de Guadalajara. **Maestría en Proceso Biotecnológicos:** 119-125.

Arrizon., J. (2005). "Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeast in high *Agave tequilana* and grape must fermentation." Antonie van Leeuwenhoek.

Arrizon., J., Gschaedler., A., (2002). "Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process." Can. J. Microbiol **48**: 965-970.

Baccou., J. C., Lambert., F., Sauvaire., Y., (1977). "Spectrophotometric Method for the Determination of Total Steroidal Sapogenin." Analyst **102**: 458-465.

Bamforth., C., W. (2007). Alimentos, fermentación y microorganismos. Acriba. Zaragoza.

CIATEJ (2004). Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas. México, CIATEJ.

Cheney., A. L., Marbach., E. P., (1962). "Modified reagents for determination of urea and ammonia " Clinical Chemistry **8**(130-132).

De la Barrera., E., Andrade., José Luis (2007). "Diversidad Fisiológica de las Plantas Mexicanas: El Caso de un Metabolismo Fotosintético Especial." Biol. Soc. Bot. Méx. **81**: 157-159.

De León., R., A., González., Hernández., L., Barba., de la Rosa., A., P., Escalante., Minakata., P., López., M., G., (2006). "Characterization of volatile compounds of Mezcal an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*." Journal of Agricultural Food Chemestry **54**: 1337-1341.

Díaz., M., D. M., Favela., Torres., E., Córdova., J., (2009). "Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of *Agave tequilana* juice by addition of yeast extract." Wiley Interscience.

Díaz., M., D., M., Marie., Line., D., Estarrón., Espinosa., M., Strehaiano., P., (2008). "Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated fom *Agave tequilana* Weber juice." Enzyme and Microbial Technology **42**: 608-616.

Escalante., M., P., Blaschek., H., P., Barba., de la Rosa., A., P., Santos., L., de León Rodríguez., A., (2008). "Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*." Letters in Applied Microbiology: 1-5.

Fleet., G., H., (2008). "Wine yeasts for the future." Federation of European Microbiological Societies **8**: 979-995.

Fonseca., G., G., Karoly Gomber.,t A., Heinzle., E., Wittmann., C., (2007). "Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the role carbon sourse." Federation of European Microbiological Societies **7**: 422-435.

Fonseca., G., Gustavo., Heinzle., Elmar., Wittmann., Christoph., Gombert., Andreas K., (2008). "The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potencial." Appl Microbiol Biotechnol **79**: 339-354.

Gaward., A., Sayed., E., Hameed., A., (1999). "Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*." Fitoterapia **70**: 371-381.

Guitart., A., Hernández Orte., P., Ferreira., V., Peña., C., Cacho., J., (1999). "Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay variety and their fermentation aromas." American Journal for enology and viticulture **50**(3): 253-258.

Hernández., O., P., Cacho.,Juan., F., Ferreira., V. (2002). "Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(10): 2892-2899.

Hérnandez., R. (2007). Estudio del efecto de la alimentación continua e intermitente de sustrato en una fermentación por lote alimentado para la producción de tequila 100% agave, Universidad de Guadalajara. **Licenciatura**

King., A., Dickison., J. R., (2000). "Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*." Yeast **16**: 499-506.

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

Lane., M. M., Morrissey., John P. (2010). "*Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow." Fungal Biology Reviews.

Lappe., O., P., Moreno., Terrazas., R., Arrizón., Gaviño., J., Herrera., Suárez., T., García., Mendonza., A., Gshaedler., Mathis., A., (2008). "Yeasts associetad with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages." Federation of European Microbiological Societies **8**: 1037-1052.

López., L. M. (2001) "Saponósidos." Ámbito Farmacéutico Fitoterapia.

López., M. G., Mancilla., Margalli N. A., Mendoza Diaz., G., (2003). "Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**: 7835-7840.

Madigan., M., T., Martinko., J.,M., Parker., J., (2004). Brock Biología de los Microorganismos. Madrid.

Manginot., C., Roustan., J. L., Sablayrolles., J. M., (1998). "Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase." Enzyme and Microbial Technology **23**: 511-517.

Mateo J.J., J. M., Huerta T., Pastor A., (1991). "Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine." International Journal of Food Microbiology **14**: 153-160.

Medeiros., A. B. P., Pandey., Ashok., Freitas., Renato J.S.,.Christen., Pierre., Soccol Carlos R., (2000). "Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surfance methodology." Biochemical Engineering Journal **6**: 33-39.

Miyakoshi., M., Tamura.,Y., Masuda., H., Mizutani., K., Tanaka., O., Ikeda., T., Ohtani., K., Kasai., R., Yamasaki., K., (2000). "Antiyeast Steroidal Saponins from *Yucca shidigera* (Mohave Yucca), a New Anti-Food-Deteriorating Agent." Journal of Natural Products **63**(3): 332-338.

Molina., G., J.,A., Botello., Alvárez., J., E., Estrada., Baltazar., A., Navarrete., Bolaños., J.,L., Jiménez., Islas., H., Cárdenas., Manríquez., M., Rico., Martínez., R., (2007).

"Compuestos Volátiles en el Mezcal." Revista Mexicana de Ingeniería Quimica **6**(1): 41-50.

Moreno., A., M., Polo., C., (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. USA, Springer.

Nally., M., C., (2005). "Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae killer* y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos." Revista Argentina de Microbiologia **37**: 73-77.

Nonklang., S., Abdel-Banat ., Babiker M.A., Cha-aim., Kamonchai., Moonjai., Nareerat., Hoshida., Hisashi., Limtong., Savitree., Yamada., Mamoru., Akada., Rinji (2008). "High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042." Applied and Environmental Microbiology **74**(24): 7514-7521.

Pätzold., R., Brückner., Hans, (2005). "Mass Spectrometric Detection and Formation of D-Amino Acids in Processed Plant Saps, Syrups, and Fruit Juice Concentrates." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 9722-9729.

Peña., A., A., Díaz., L., Medina., A., Labastida., C., Capella., S., Vera., L., (2004). "Chacaterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry " Journal of Chromatography A **1027**: 131-136.

Pinal., L., Cedeño., M., Gutiérrez., H., Alvárez Jacobs., J., (1997). "Fermentation parameters influencieng higher alcohol production in the tequila process." Biotechnology letters **19**(1): 45-47.

Rendón., S., L. A., Méndez., Magdub., A., Hernández., Terrones., L., (2007). "El jarabe de Henequén." Revista Fitotécnica Mexicana **30**(4): 463-467.

Romano P., F. C., Paraggio M., Caruso M., Capace A., (2003). "Function of yeast species and strains in wine flavour." International Journal of Food Microbiology **86**: 169-180.

SAGARPA (2004). Plan Rector Sistema Nacional Maguey-Mezcal.

SAGARPA (2009) "El Mezcal Mexicano se vende en 27 países de tres continentes." http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2009-B044.aspx.

Sánchez., M., A., Hope ., P., (1953). "Agave Juice. Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species." Journal of Agricultural and Food Chemistry **1**(3): 246-249.

SCFI (1997). Bebidas Alcohólicas, Mezcal-Especifícaciones. NOM-070-SCFI-1997.

SE (2010) "Empresarios de Estados Unidos Realizan una misión comercial en México, en busca de proveedores de mezcal." http://www.promexico.gob.mx/work/sites/Promexico/resources/LocalContent/1847/2/BP_0710_190710.pdf.

Segura., G., L E., (2010). Identificación y Caracterización por Métodos Móleculares de Levaduras Aisladas del Proceso de Elaboración del Mezcal en el Estado de Oaxaca. Posgrado Interistitucional en Ciencia y Tecnología. Guadalajara, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. **Maestria:** 177.

Shiau., I.-L., Shih., Tzenge-Lien, Wang., Ya-Nang, Chen., Hsin-Tai, Lan., Haw-Farn, Lin Han., Chien, Yang., Bing-Yuan, Ko., Chun-Han, Murase., Yasuhide (2009). "Quantification for Saponin from a Soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn) in Cleaning Products by a Chromatographic and two Colorimetric Assays." J. Fac. Agr. **54**(1): 215-221.

Silos., E. H. (2005). Composición química de aguamiel y pencas de *Agave salmiana* Gentry. Hermosillo, Sonora, Centro de las Artes Universidad de Sonora.

Takoi., K., Koie., Koichiro., Itoga., Yutaka., Katayama., Yuta., Shimase., Masayuki., Nakayama., Yasuyuki., Watari., Junji (2010). "Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**: 5050-5058.

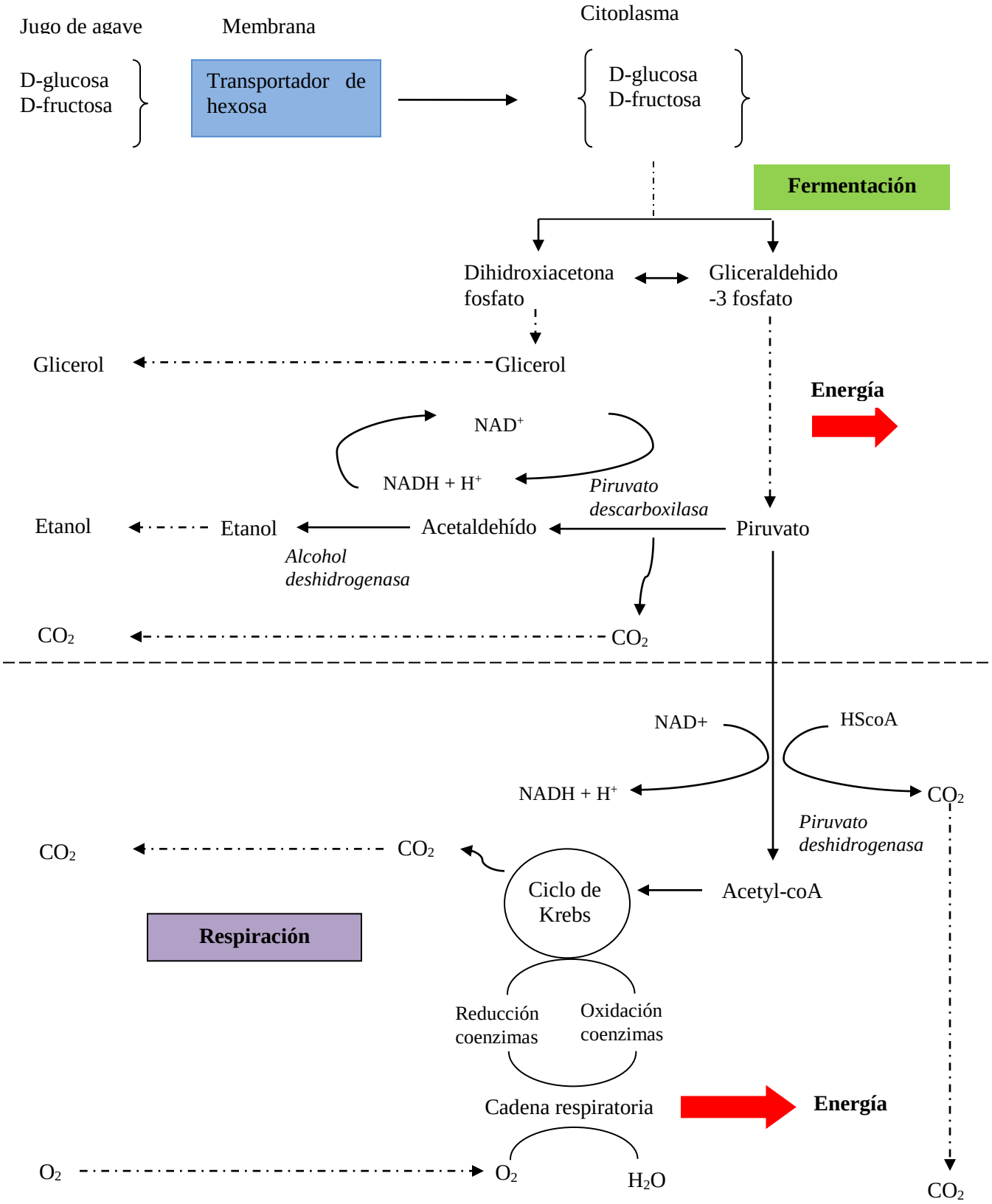
Tomasso., M. (2004) "Tolerancia de las levaduras al etanol." <http://www.utu.edu.uy/Escuelas/departamentos/canelones/vitivinicultura/Bioquimica%20Enologica/Teoricos/Tolerancia%20etanol.PDF>.

Valenzuela., A. (2007). "Signos distintivos en los alimentos y bebidas mexicanas: una propuesta a partir de la denominación de origen mezcal." Revista Salud Pública y Nutrición **8**(2): 1-16.

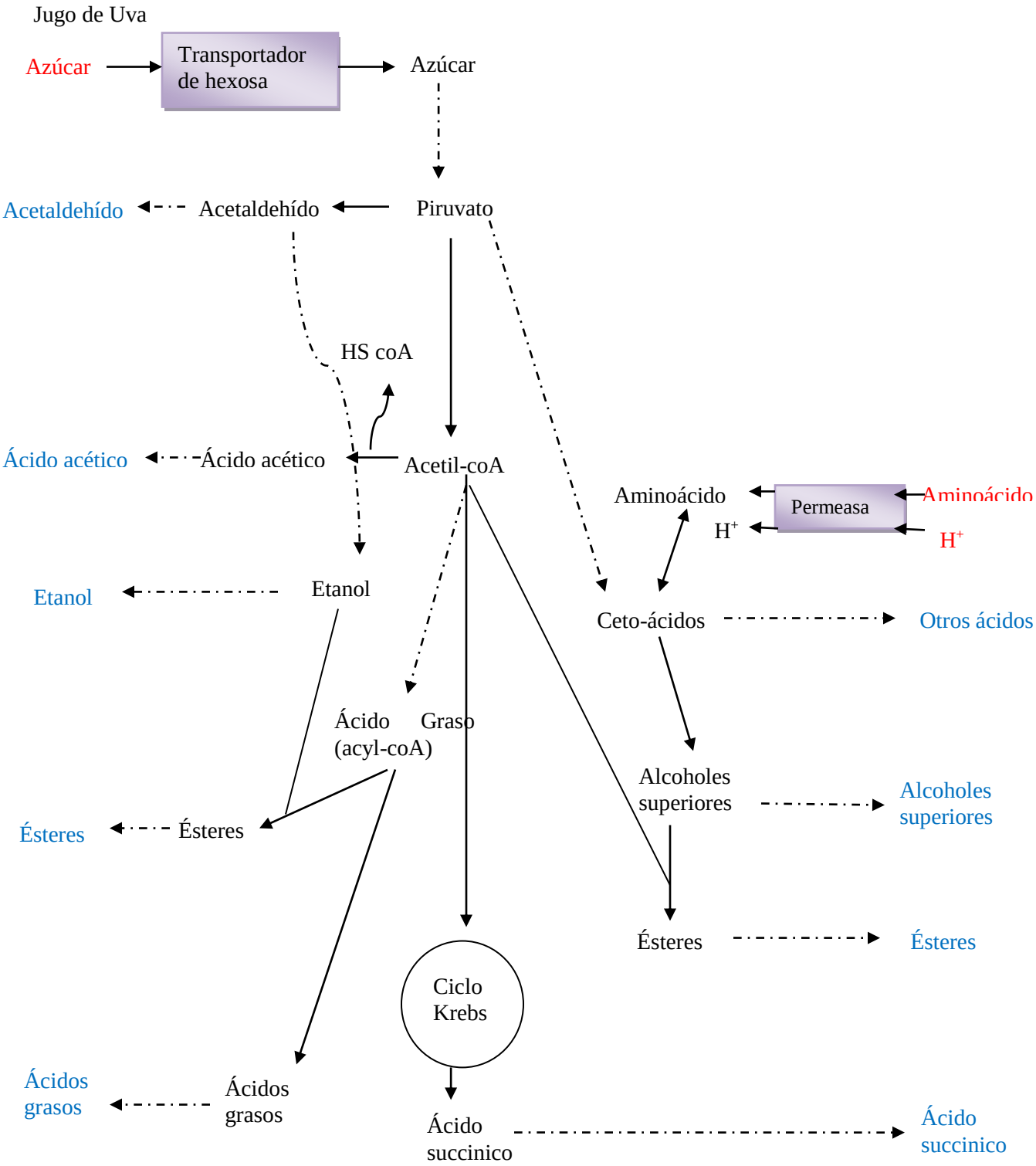
Vázquez., G., J., Cházaro., M., Hernández., Vera., G., Berrios., Flores., E., Vargas., Rodríguez., Y., (2007). Agaves del Occidente de México. S. d. F. d. Biodiversidad. **3**.

Yokosuka., A., Yoshihiro., Mimaki., (2009). "Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity." Phytochemistry **70**: 807-815.

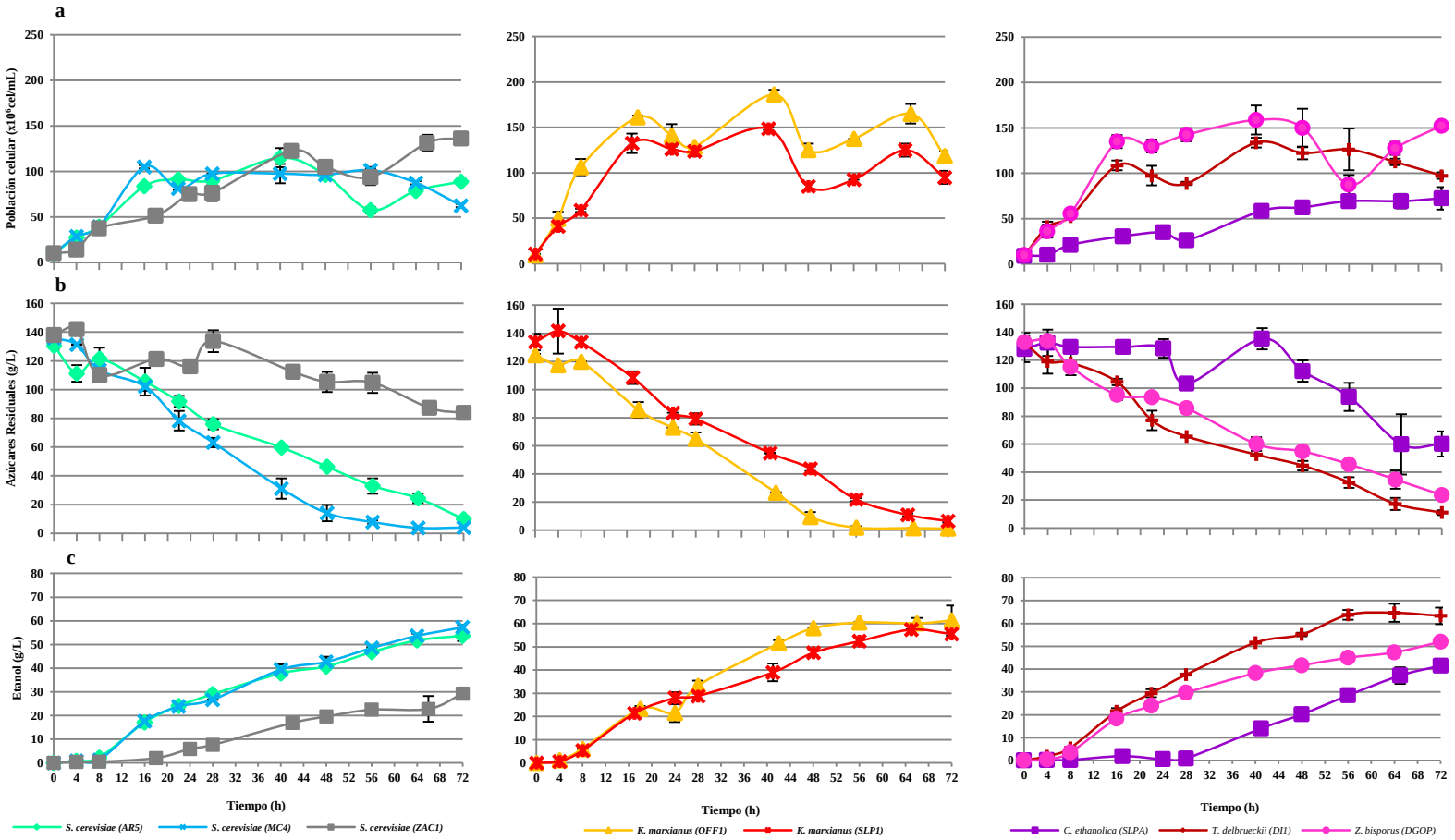
Anexo 1. Fermentación y Respiración de la levadura.



Anexo 2. Biosíntesis de otros subproductos

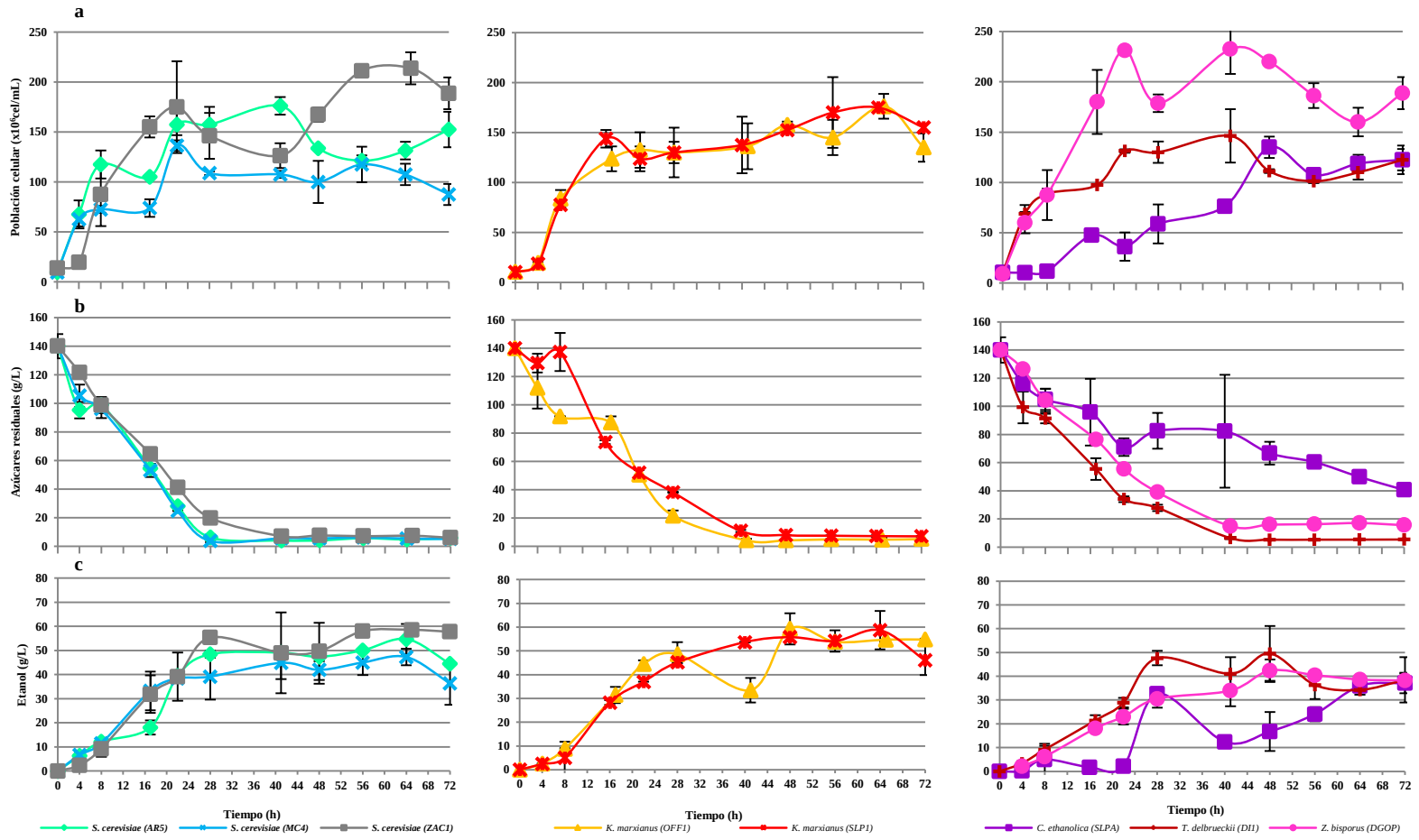


Anexo 3. Cinética de fermentación: Producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol.



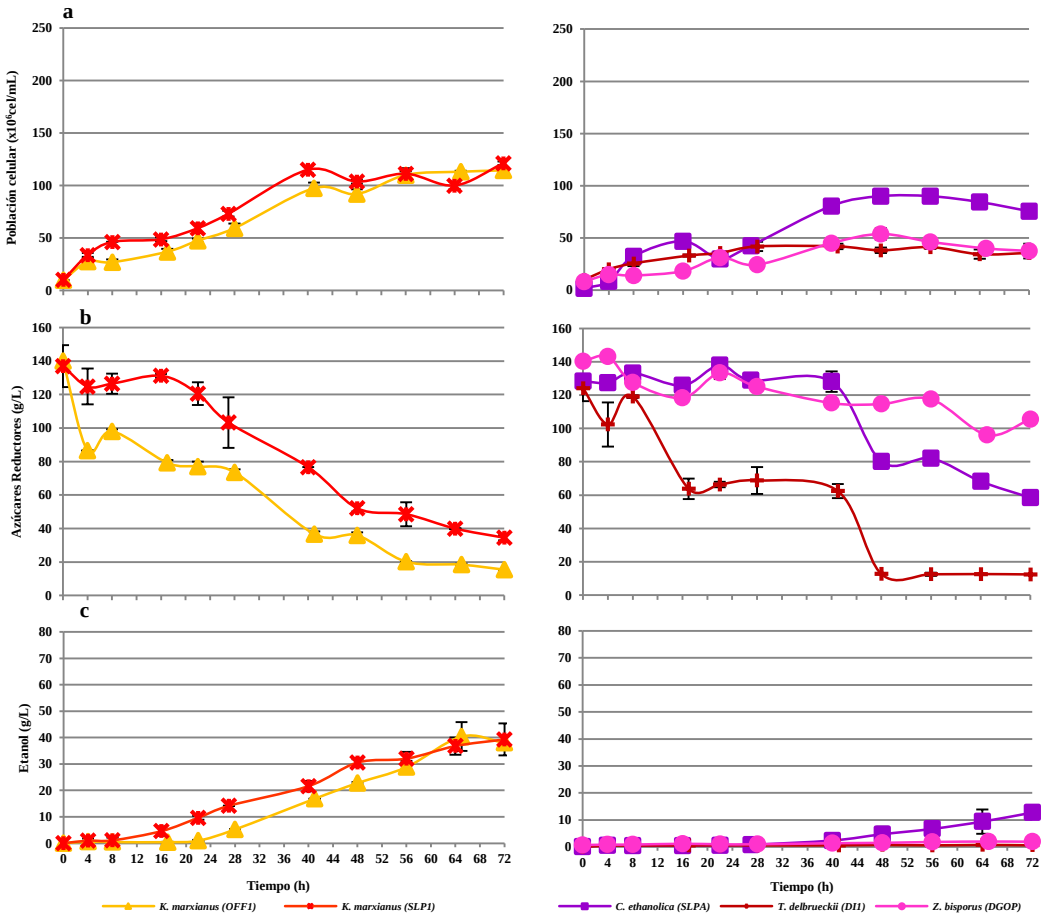
Gráfica 3.1. Cinética de fermentación en jugo de *A. angustifolia* **a.** Población celular, **b.** Azúcares residuales, **c.** Producción de etanol.

Anexo 3. Cinética de fermentación: Producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol.



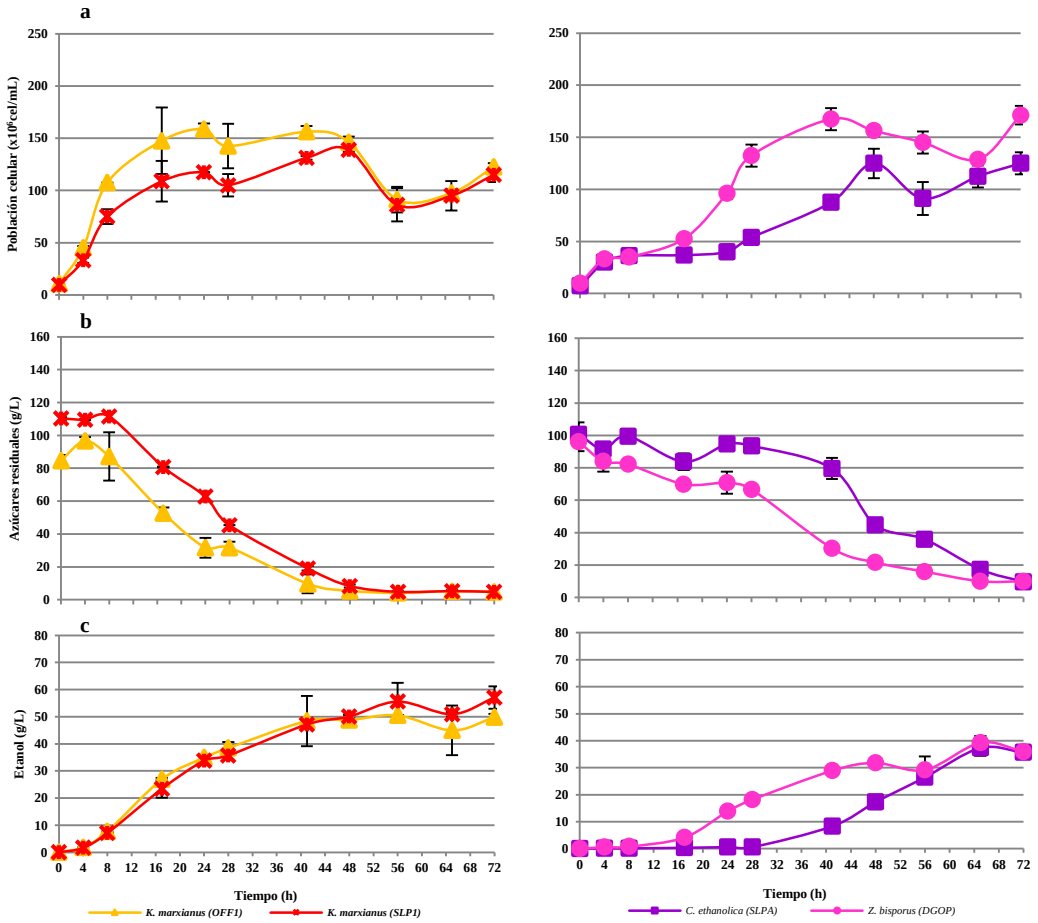
Gráfica 3.2. Cinética de fermentación en jugo de *A. cupreata* **a.** Población celular, **b.** Azúcares residuales, **c.** Producción de etanol.

Anexo 3. Cinética de fermentación: Producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol.



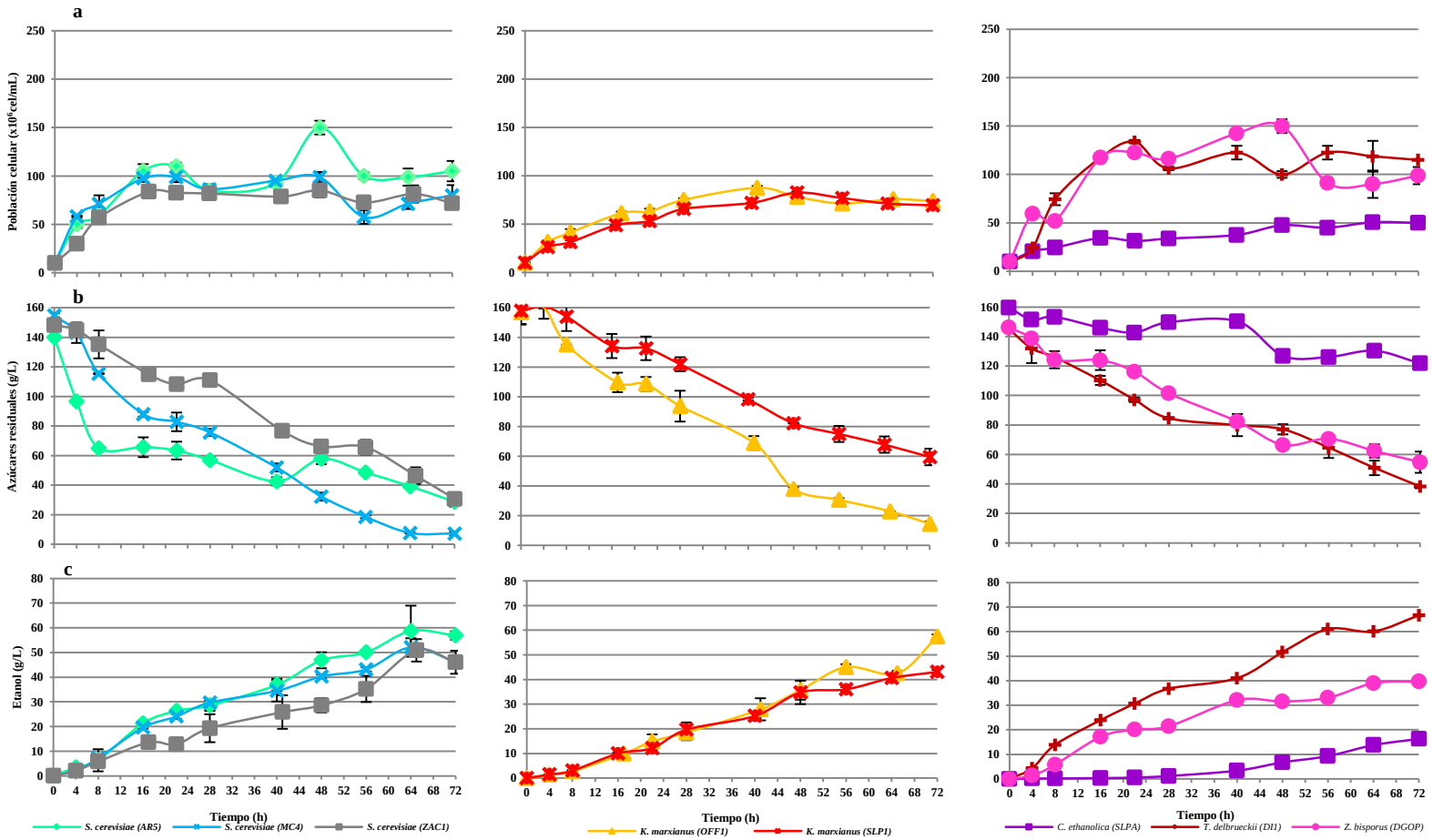
Gráfica 3.3. Cinética de fermentación en jugo de *A. durangensis* **a.** Población celular, **b.** Azúcares residuales, **c.** Producción de etanol.

Anexo 3. Cinética de fermentación: Producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol.



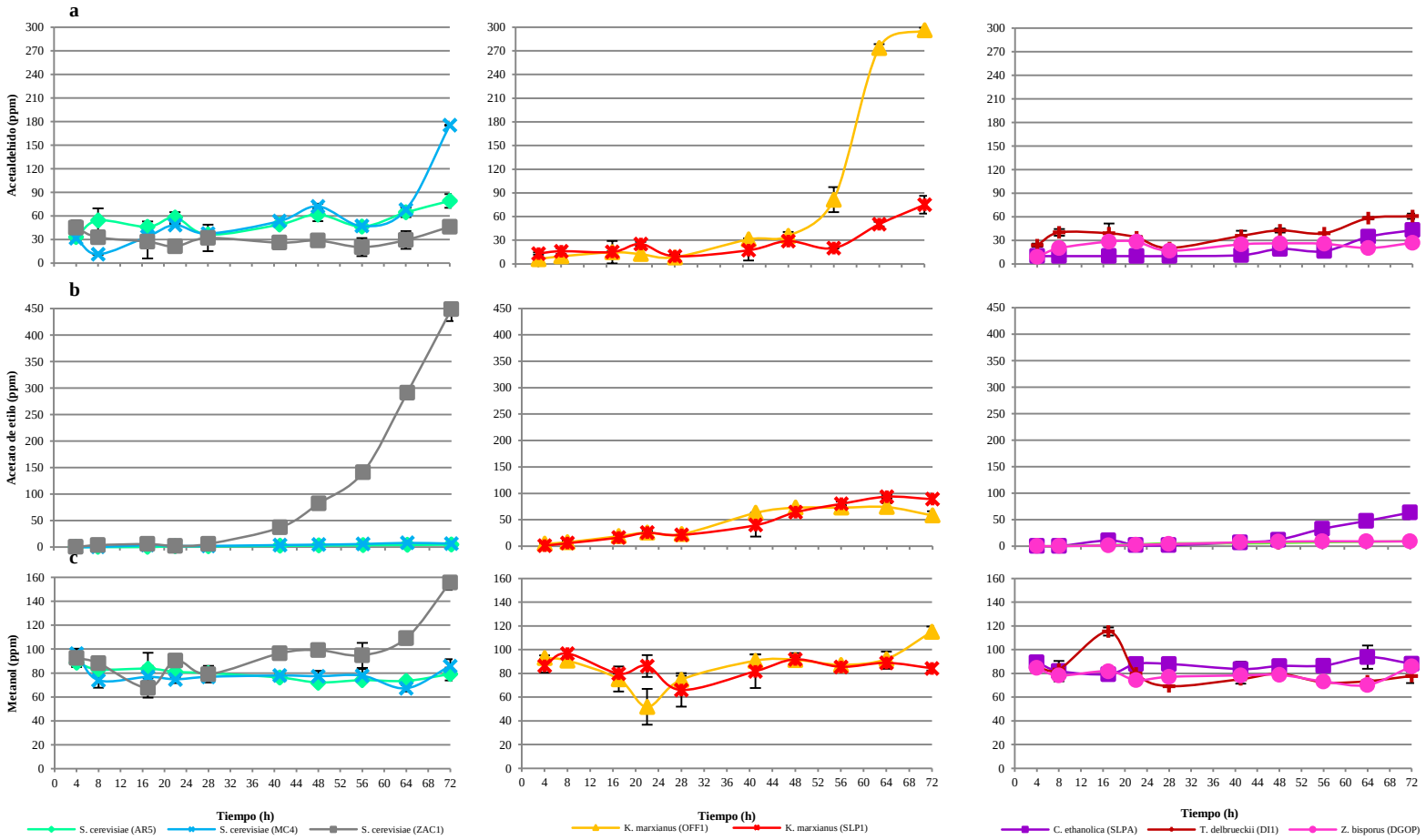
Gráfica 3.4. Cinética de fermentación en jugo de *A. salmiana* **a.** Población celular, **b.** Azúcares residuales, **c.** Producción de etanol.

Anexo 3. Cinética de fermentación: Producción de biomasa, consumo de azúcares, producción de etanol.



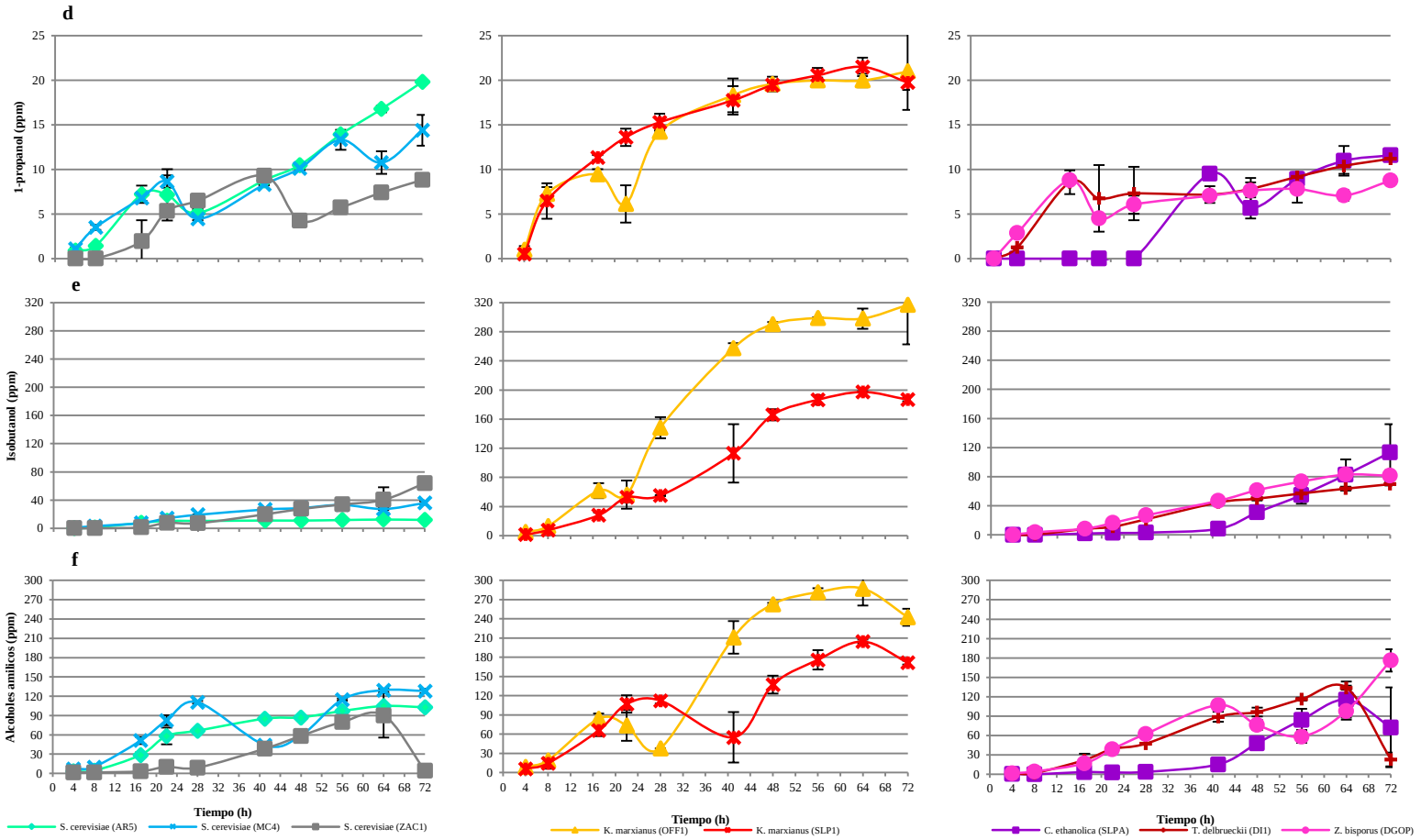
Gráfica 3.5. Cinética de fermentación en jugo de *A. tequilana* **a.** Población celular, **b.** Azúcares residuales, **c.** Producción de etanol.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



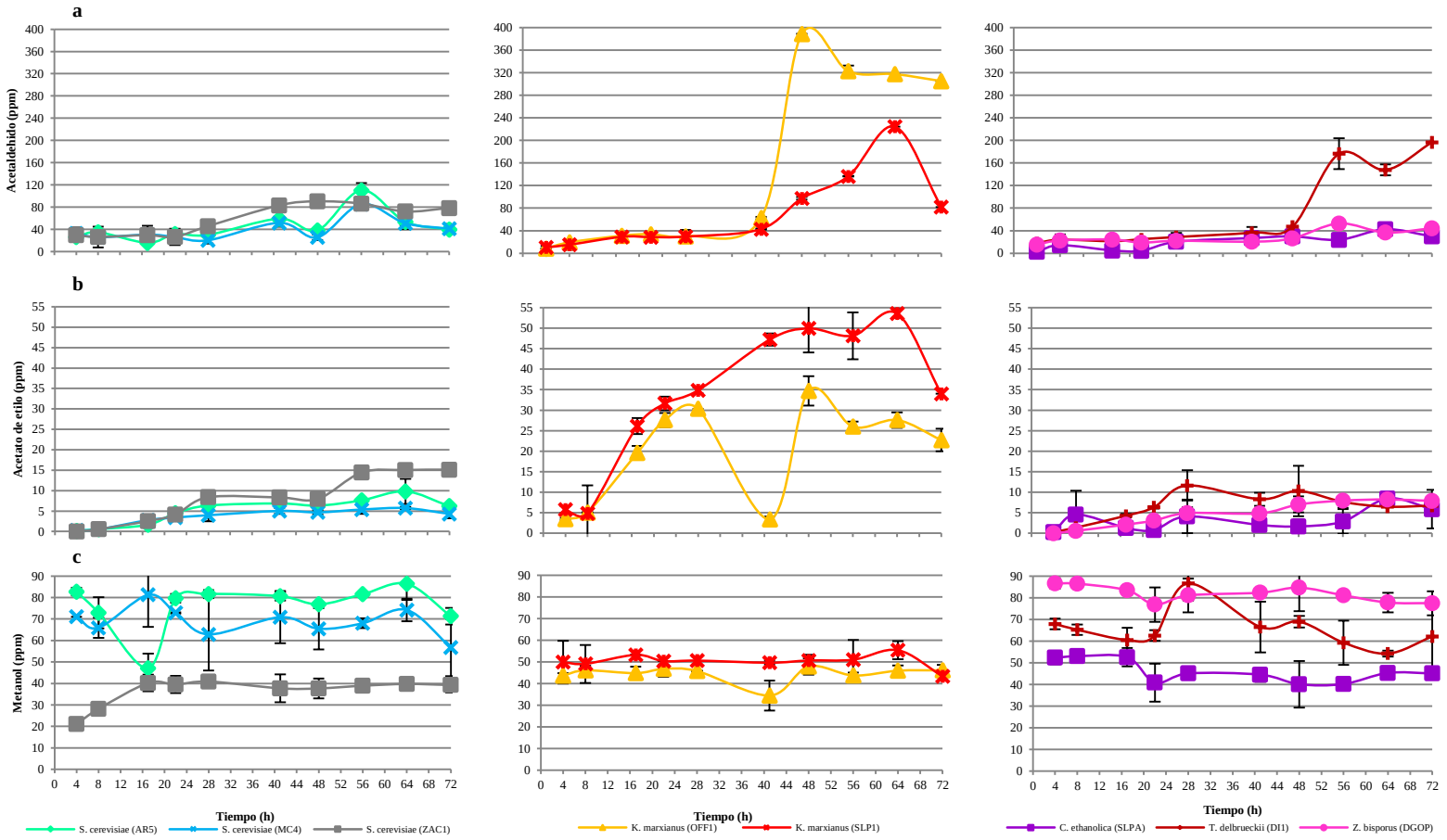
Gráfica 4.1. Generación de volátiles en jugo de *A. angustifolia* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



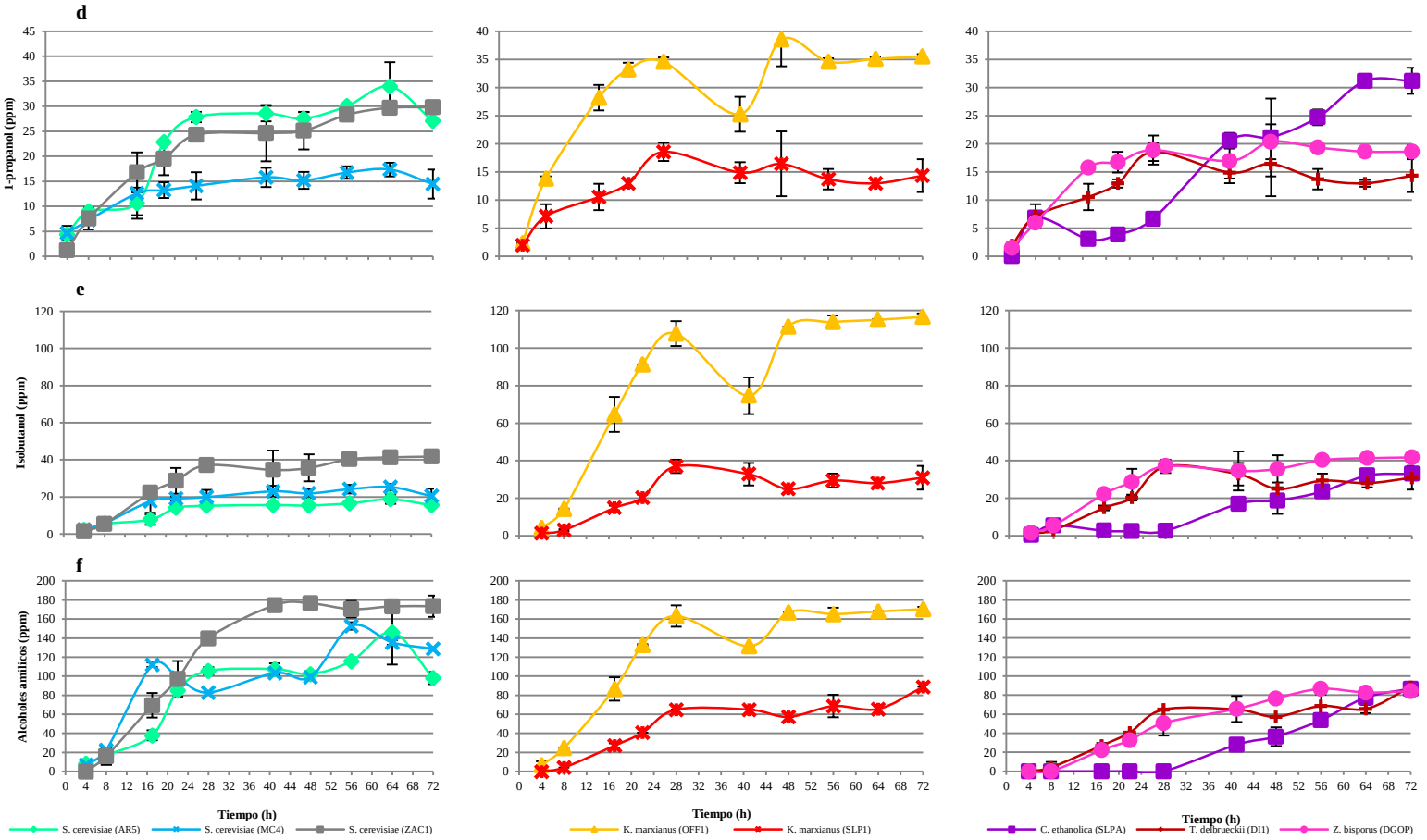
Gráfica 4.1. Generación de volátiles en jugo de *A. angustifolia* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



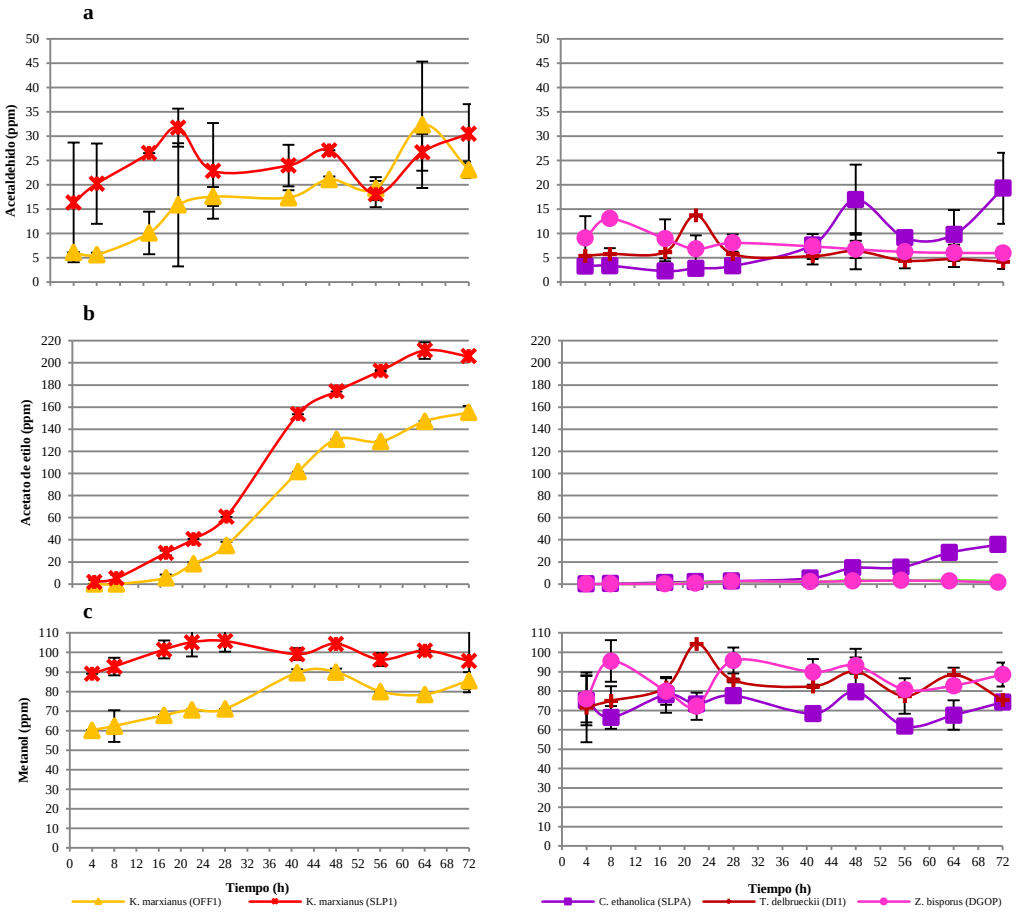
Gráfica 4.2. Generación de volátiles en jugo de *A. cupreata* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



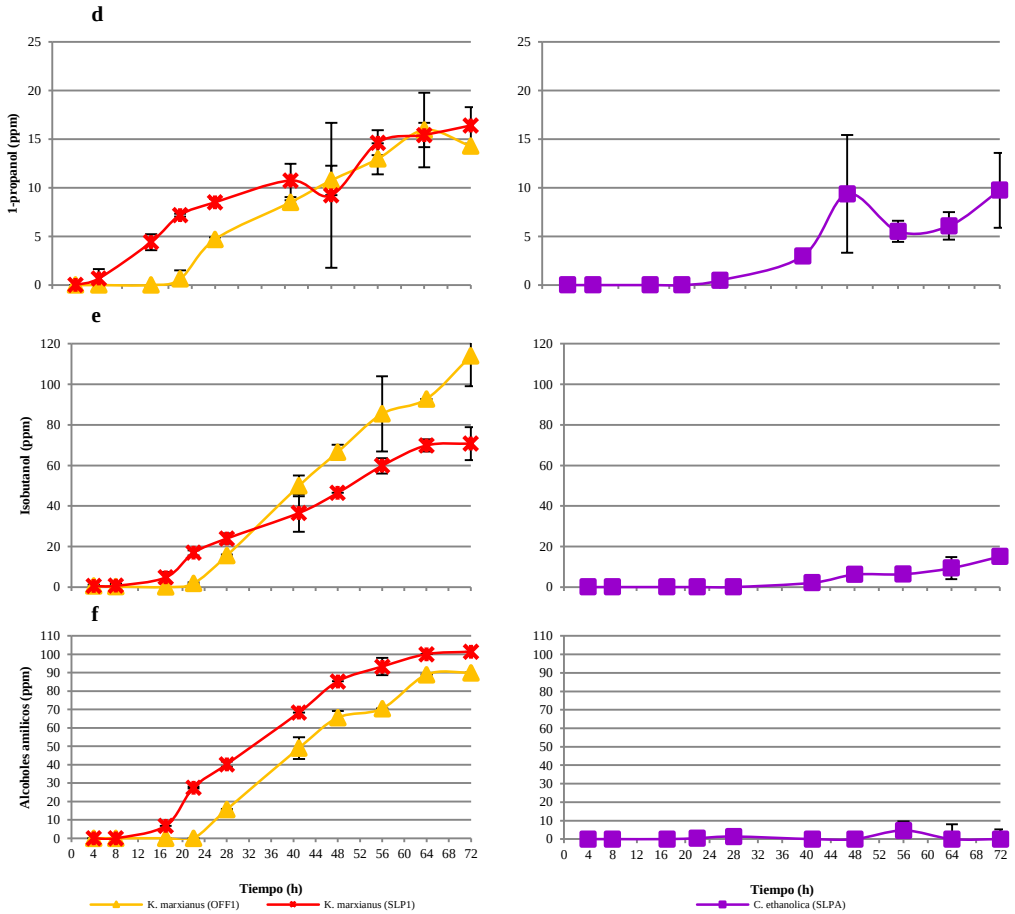
Gráfica 4.2. Generación de volátiles en jugo de *A. cupreata* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



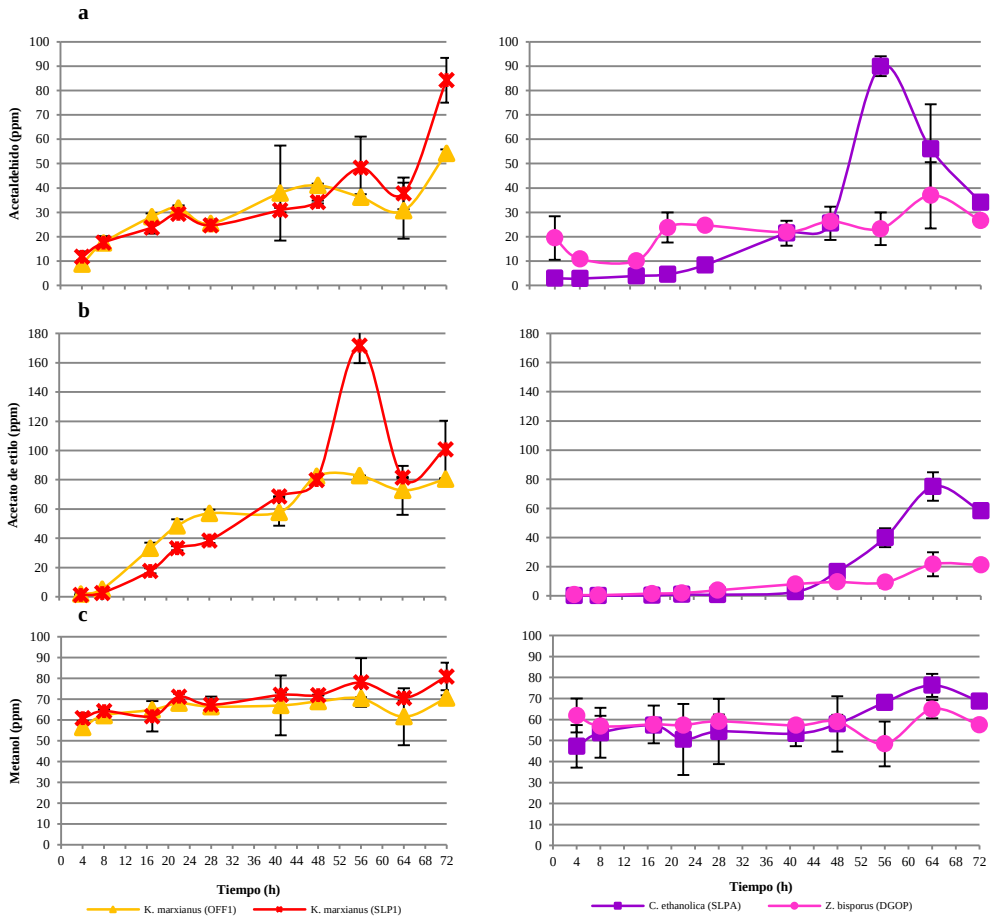
Gráfica 4.3. Generación de volátiles en jugo de *A. durangensis* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



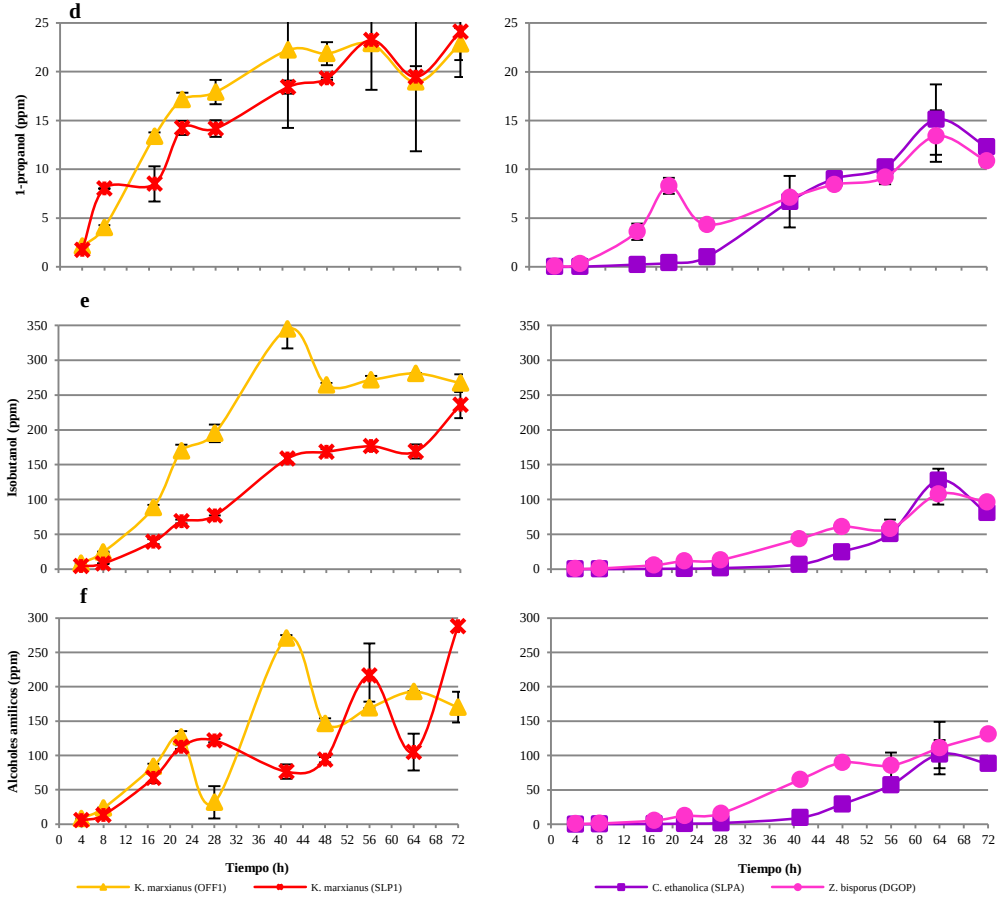
Gráfica 4.3. Generación de volátiles en jugo de *A. durangensis* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



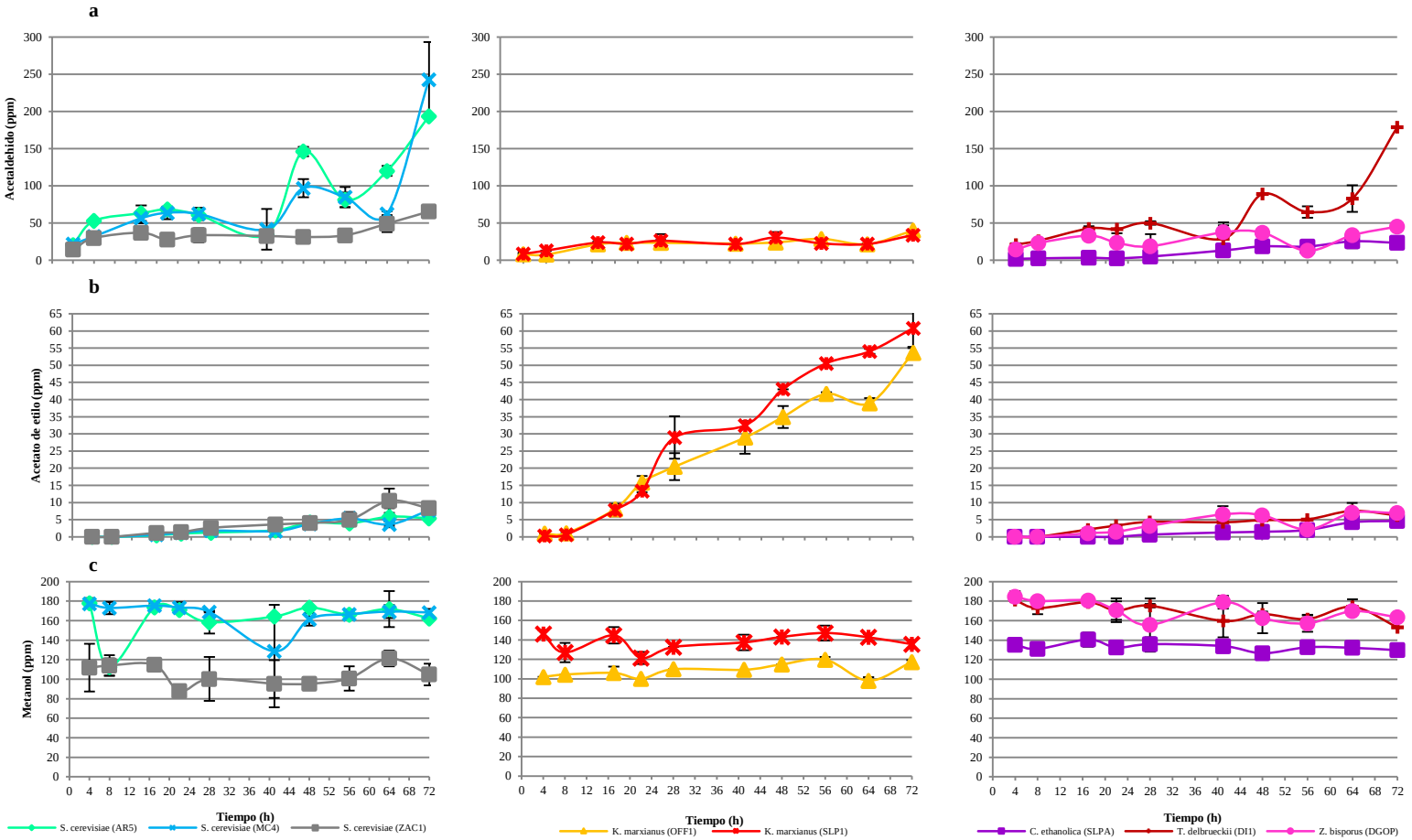
Gráfica 4.4. Generación de volátiles en jugo de *A. salmiana* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



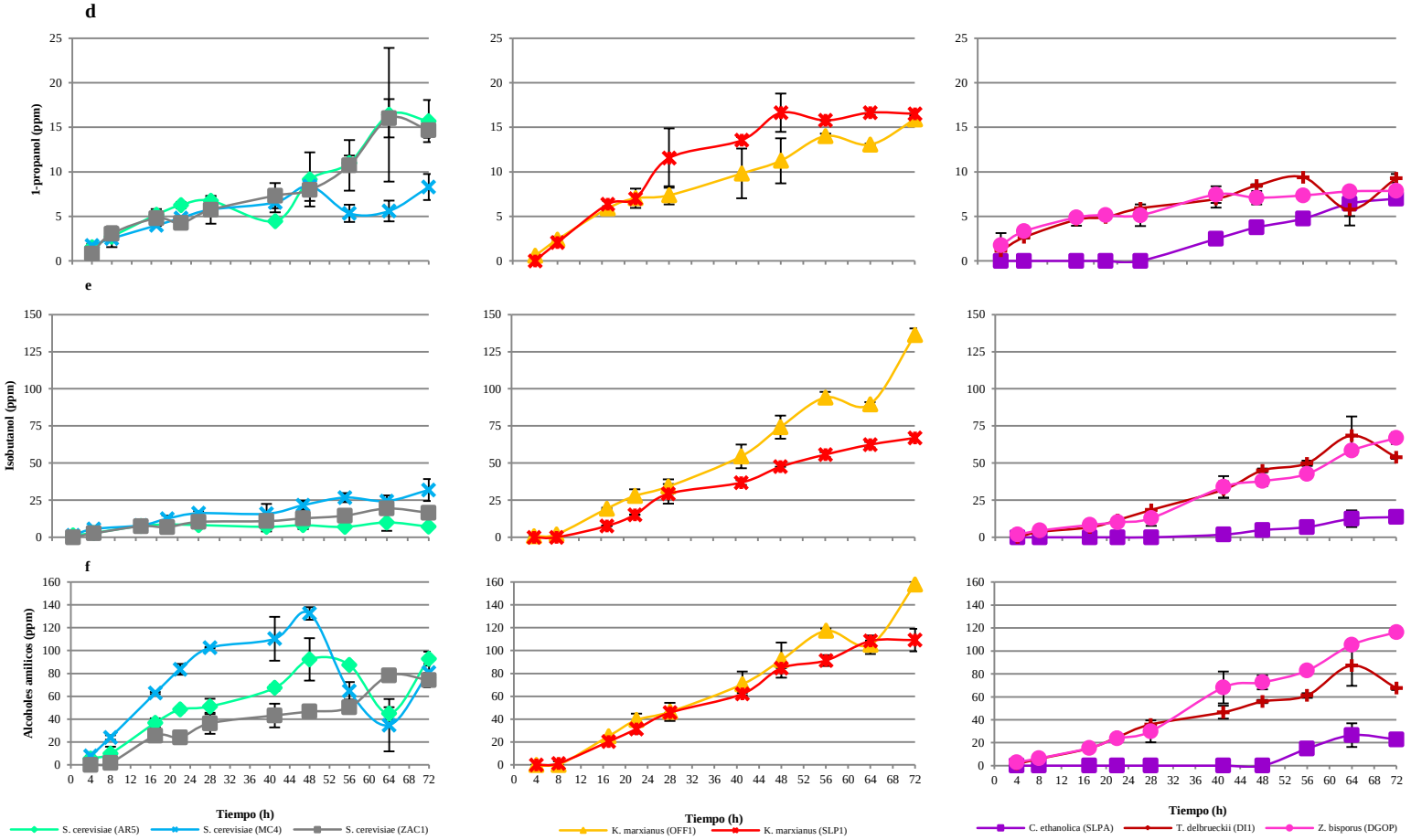
Gráfica 4.4. Generación de volátiles en jugo de *A. salmiana* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



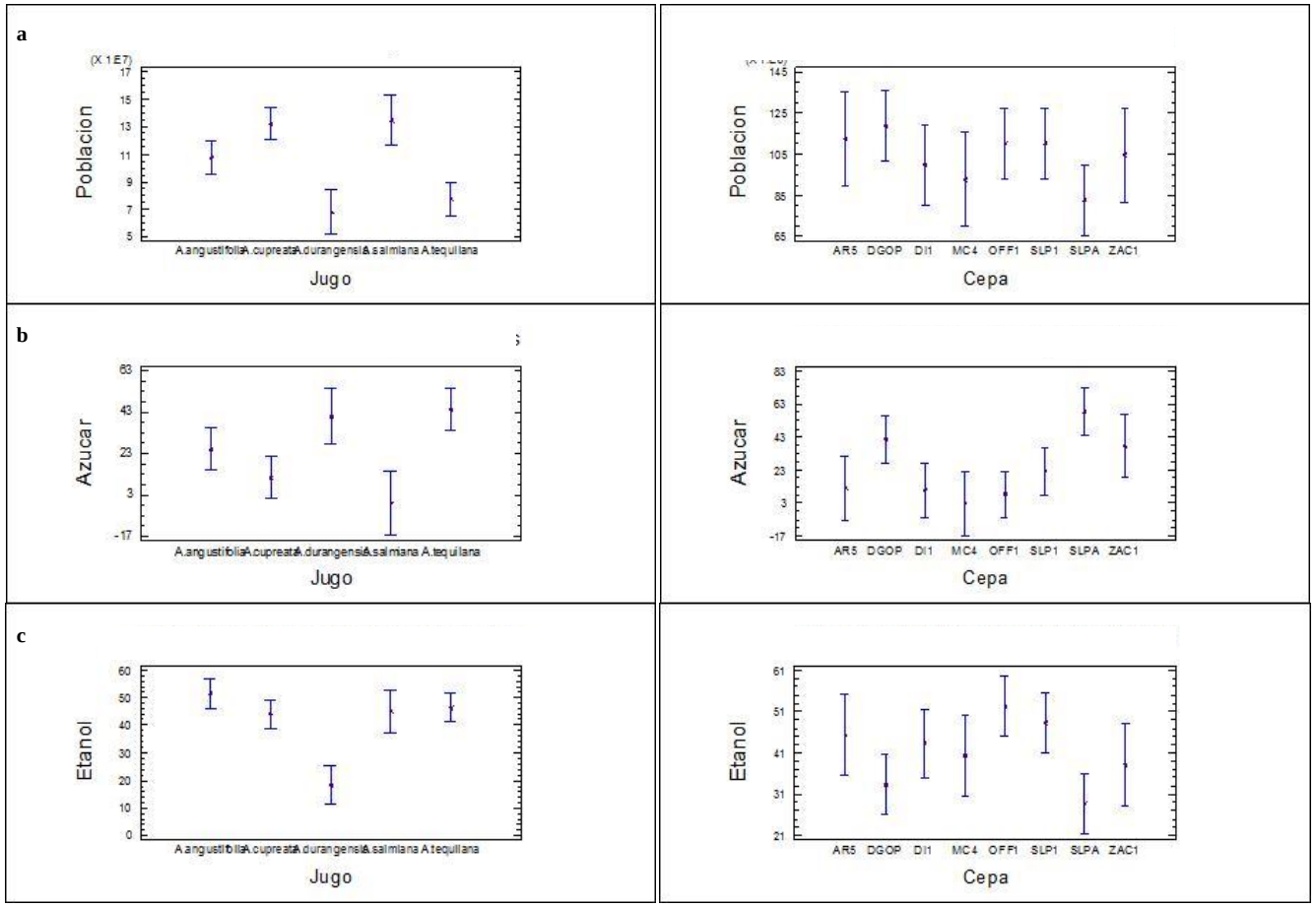
Gráfica 4.5. Generación de volátiles en jugo de *A. tequilana* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos

Anexo 4. Cinética de fermentación: Generación de volátiles



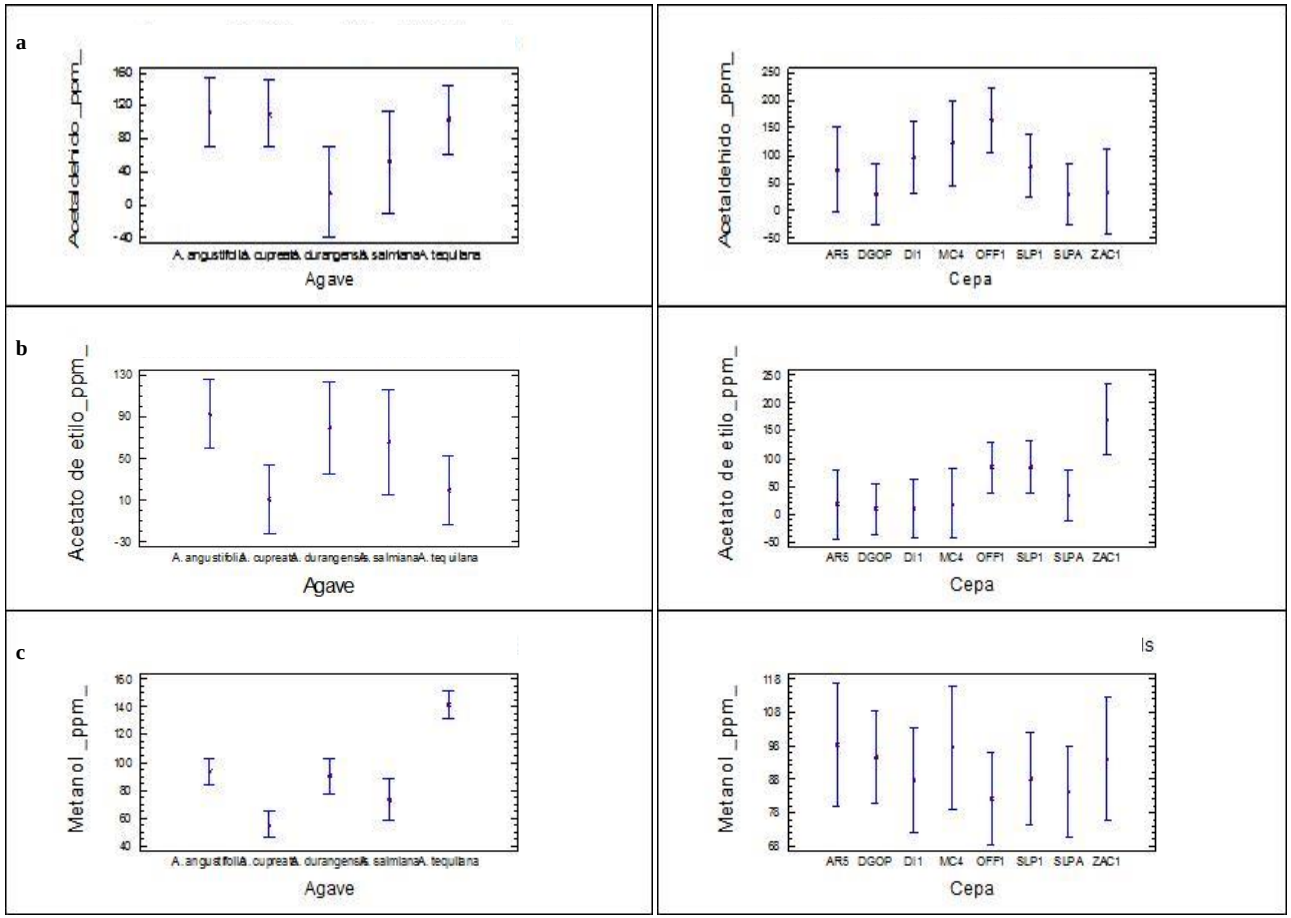
Gráfica 4.5. Generación de volátiles en jugo de *A. tequilana* **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol, **d.** 1-propanol, **e.** isobutanol, **f.** alcoholes amílicos.

Anexo 5. Cinética de fermentación: Análisis de varianza



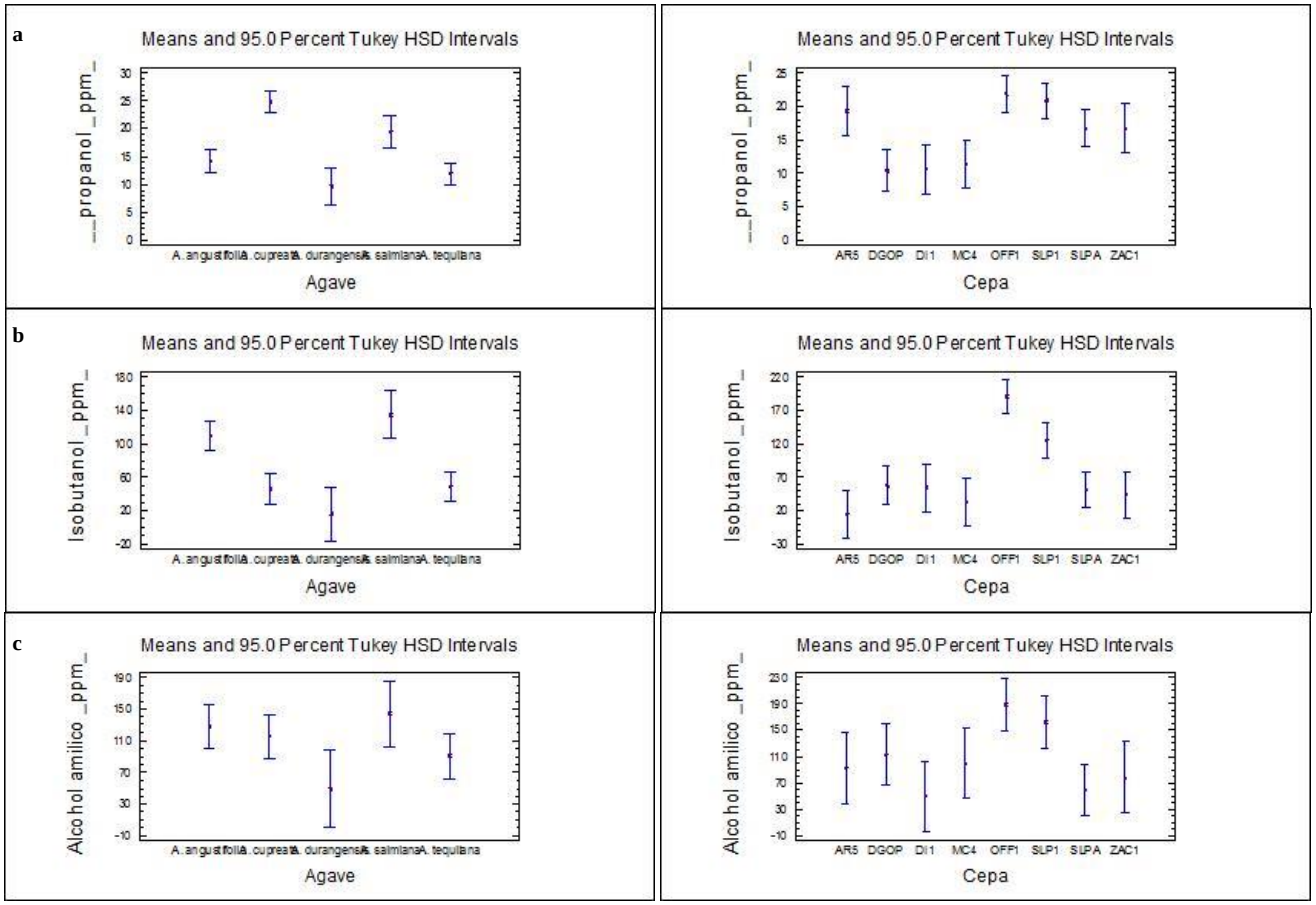
Gráfica 5.1. Análisis de varianza de las cinéticas de fermentación en los diferentes jugos de agave y con las diferentes cepas mezcaleras **a.** generación de población, **b.** azúcares residuales, **c.** producción de etanol.

Anexo 5. Cinética de fermentación: Análisis de varianza



Gráfica 5.2. Análisis de varianza de las cinéticas de fermentación en los diferentes jugos de agave y con las diferentes cepas mezcaleras **a.** acetaldehído, **b.** acetato de etilo, **c.** metanol.

Anexo 5. Cinética de fermentación: Análisis de varianza



Gráfica 5.3. Análisis de varianza de las cinéticas de fermentación en los diferentes jugos de agave y con las diferentes cepas mezcaleras **a.** 1-propanol, **b.** isobutanol, **c.** alcoholes amilícos