

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ESCALAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA DE LA
LEVADURA KLUYVEROMYCES SP. PE1 Y SU EVALUACION EN LA
PRODUCCION DE TEQUILA A NIVEL INDUSTRIAL”**

TESIS PROFESIONAL

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO
DE:**

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

p. QFB EDITH LORENA ARROYO ORDAZ

ASESORES DE TESIS

**DR. JESUS CAMPOS GARCIA
DR. CARLOS R. SOSA AGUIRRE**

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE 2006

Contenido	Página
A. LISTA DE CUADROS.....	5
B. LISTA DE FIGURAS.....	6
C. LISTA DE ANEXOS.....	7
D. RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. REVISION DE LITERATURA.....	11
II.1 Las levaduras: definición y características generales.....	11
II.1.1 Crecimiento y división celular.....	11
II.1.2 Estructura y funciones básicas de las levaduras.....	12
II.1.3 Distribución de las levaduras en el medio ambiente.....	12
II.2 Levaduras fermentadoras.....	13
II.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
II.2.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
II.2.2.1 Factores que afectan el crecimiento de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	15
II.2.2.1.1 Furfural e Hidroximetilfurfural (HMF).....	15
II.3 Escalamiento de biomasa de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ...	16
II.4 Fermentación de mostos de agave.....	17
II.4.1 Cosecha de piñas de agave.....	17
II.4.2 Cocción de las piñas de agave.....	18
II.4.2.1 Hornos.....	18
II.4.2.2 Autoclaves.....	19
II.4.3 Condiciones y etapas del cocimiento en la autoclave.....	20
II.4.3.1 Cambios fisicoquímicos durante el cocimiento del agave.....	21
II.4.3.2 Color en jugo de agave.....	21
II.4.4 Molienda de las piñas de agave.....	22
II.4.5 Fermentación de mostos de agave a través de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> sp PE1.....	23
II.4.5.1 Equipo necesario para llevar a cabo la fermentación.....	24
II.4.5.2 Compuestos volátiles generados durante la fermentación de mostos.....	26
II.4.5.2.1 Alcoholes superiores.....	26
II.4.5.2.2 Carbonilos.....	26

II.4.5.2.3 Ácidos grasos.....	27
II.4.5.2.4 Metanol.....	28
II.5 Destilación	28
II.5.1 Partes que componen un alambique.....	28
II.5.2 Factores que influyen en la eficiencia de los alambiques.....	29
II.5.3 Destilación diferencial.....	30
II.5.3.1 Destrozado.....	30
II.5.3.2 Rectificación.....	31
II.5.4 Compuestos destilados regulados por la Norma Oficial Mexicana 006SCFI-2005.....	32
II.5.5 Tipos y categorías de tequilas.....	32
III. JUSTIFICACION.....	34
IV. HIPOTESIS.....	34
V. OBJETIVOS.....	34
VI. MATERIALES Y METODOS.....	35
VI. 1. Escalamiento de biomasa levadura <i>Kluyveromyces marxianus sp PE1</i>	35
VI.2. Segunda etapa, cultivo en biorreactor.....	36
VI.3. Producción de biomasa en cultivo de lote alimentado.....	36
VI.4. Escalamiento de biomasa de la levadura a nivel industrial.....	37
VI.5. Cosecha de piñas de agave.....	37
VI.6. Cocción de las piñas de agave.....	37
VI.7. Molienda de las piñas de agave cocidas.....	38
VI.8. Fermentación de mosto.....	38
VI.9. Destilación.....	38
VI.10. Análisis del tequila producido.....	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
VII.1 Crecimiento de la levadura <i>K. marxianus sp PE1</i> en biorreactor y tanques de acero.....	40
VII.2 Producción de etanol a través de la levadura <i>K. marxianus sp PE1</i>	41
VII.3 Riqueza alcohólica producida por la levadura <i>K. marxianus sp PE1</i> y la <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
VII.4 Rendimientos de producción obtenidos al finalizar la fermentación de mostos a través de la levadura <i>K. marxianus sp PE1</i>	45

VII.5 Perfil aromático del tequila “El Consuelo”	47
VIII. CONCLUSION.....	51
IX. LITERATURA CITADA.....	52

LISTA DE TABLAS	Páginas
1. Principales necesidades de las levaduras y función celular de cada un de ellos.....	12
2. Influencia de las diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y producción de componentes aromáticos después de 24 horas de cultivo....	14
3. Componentes importantes formados durante el proceso de cocción de las piñas de agave tequilana weber var. Azul.....	22
4. Punto de ebullición de los compuestos separados en el proceso de destilación.....	31
5. Concentración de congéneres que la NOM-006SCFI-2005 establece para tequilas blancos.....	32
6.- Consumo de azúcares reductores y transformación de estos en etanol por la levadura K. marxianus sp PE1 en 90 horas de fermentación.....	42
7. Compuestos identificados en el tequila producido por la levadura <i>Kluyveromyces marxianus sp PE1</i>	50

LISTA DE FIGURAS	Páginas
1 Biorreactor de 4 litros de capacidad.....	16
2 Cosecha de las piñas de agave.....	17
3 Piña rasurada.....	17
4 Piñas de agave listas para su cocción.....	18
5 Autoclave Empresa Embajador Jalisciense.....	19
6 Acomodo de las piñas dentro de la autoclave.....	19
7 Piñas de agave antes de ser sometidas al proceso de cocción.....	20
8 Piñas de agave sometidas al proceso de cocción.....	20
9 Desgarradora de la fábrica Sauza.....	23
10 Desgarradora de la fábrica Embajador Jalisciense.....	23
11 Mosto fermentable.....	24
12 Mosto fermentado.....	24
13 Tanques de acero inoxidable con un volumen de 15,000 litros Fábrica Embajador Jalisciense.....	25
14 Tanques de madera Fábrica Sauza.....	26
15 Alambique Fábrica Sauza.....	29
16 Alambique Fábrica Embajador Jalisciense.....	29
17 Barricas de roble blanco.....	33
18 Curva de Crecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> sp PE1 en biorreactor y tanques de acero.....	41
19 Producción de etanol a diferentes tiempos de fermentación de mostos de Agave.....	44
20 Comparativo de la riqueza alcohólica producida por la levadura <i>K.</i> <i>marxianus</i> sp PE1 y la levadura utilizada normalmente en la fermentación de los mostos.....	45
21 Rendimientos de producción de la levadura <i>K. marxianus</i> sp PE1 y la levadura utilizada en la producción del tequila Embajador Jalisciense..	46
22 Tequila producido por dos levaduras diferentes a partir de 133090 Kg. de Agave.....	46
23 Perfil aromático del tequila “El Consuelo”.....	48

24	Perfil aromático del tequila “Embajador Jalisciense”	49
LISTA DE ANEXOS		Páginas
	Registro de eficiencias de hidrólisis de extracción.....	57
	Resultados de operación de destrozado y cantidad del tequila obtenido durante el proceso.....	58

Resumen

El tequila es una bebida alcohólica obtenida de la destilación y rectificación de mostos derivados de la molienda de las cabezas maduras de agave, previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica por medio de levaduras fermentadoras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, diversos estudios realizados demuestran la capacidad fermentativa de varias levaduras aisladas de mostos de agave, entre ellas se puede mencionar a *Geotrichum candidum*, y *Kluyveromyces marxianus* por lo que el estudio de estas a nivel industrial se muestra como un reto importante en la industria tequilera de nuestro país.

El siguiente documento muestra el comportamiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus* a nivel laboratorio y su posterior estudio a nivel industrial en cuanto a su velocidad de crecimiento en biorreactor y tanques de fermentación, la capacidad y velocidad de fermentación en cantidades elevadas de mostos fermentables (226,253 litros) y la cantidad de compuestos formados por la misma durante este tiempo. La capacidad y velocidad fermentativa y los compuestos generados durante la misma son identificados por medio de cromatografías en HPLC y GC-MS.

Los resultados obtenidos en cuanto a la velocidad de crecimiento en biorreactor y tanques muestran las condiciones mas adecuadas para la obtención de cantidades elevadas de biomasa o pie de levadura; en cuanto a la velocidad de fermentación es significativamente admirable ya que tiene la capacidad de lograr la fermentación de mostos en 40 horas obteniendo riquezas alcohólicas de hasta 7.5 v/v de alcohol, mientras que otras empresas requieren de 90 horas para su fermentación y obtienen riquezas alcohólicas de entre 4 y 6.5 v/v alcohol, los compuestos generados por esta levadura son compuestos organolépticos que le confieren al tequila características especiales . La cantidad de estos compuestos se apega a los criterios de la NOM-006 SCF1-2005. Estos resultados muestran la importancia de utilizar levaduras diferentes a la *Saccharomyces marxianus* ya que demostramos la velocidad de fermentación que conlleva a una disminución en los costos de producción.

Palabras clave: Producción de tequila, *Kluyveromyces marxianus*, Riquezas alcohólicas.

I.- INTRODUCCION

Las menciones más antiguas sobre la existencia del mezcal o Agave Tequilana Weber var. Azul y sus diferentes usos se remonta a la época precortesiana.

Se sabe que la palabra tequila proviene del náhuatl *tequi*, que significa cortar y *la* que significa lugar; por lo que tequila significa etimológicamente “lugar en donde se corta o lugar en donde se paga tributo.

El tequila, bebida tradicional de México, se obtiene a partir de la planta endémica de la región del llamado volcán de Tequila. En la época precortesiana ese vegetal se conoció comúnmente como mezcalmetl y en la época colonial como maguey. Dicha especie vegetal fue conocida a partir de 1902 como Agave Tequilana Weber var. Azul, que sin duda es “la más mexicana de las especies vegetales” y cuya silueta, obra maestra de la naturaleza, es conocida y asociada a un elemento netamente mexicano: el tequila.

Para lograr la elaboración de esta bebida es necesario que la planta de agave sufra una serie de etapas que influyen en el rendimiento y propiedades organolépticas y fisicoquímicas del producto final. La primera etapa para la elaboración del tequila es el cocimiento, que es una etapa particularmente importante, ya que además de la generación de azúcares fermentables por hidrólisis de la inulina presente en el agave, que lleva una serie de reacciones químicas, como la de Maillard, que genera muchos de los compuestos responsables de las características organolépticas del tequila. Una vez terminado el proceso de cocción se realiza la molienda del mismo obteniéndose los azúcares que serán transformados a etanol durante la fermentación, que sin duda es la etapa clave en el complejo proceso de elaboración de las bebidas alcohólicas. La característica principal de esta etapa es la intervención de seres vivos, de los cuales se han identificado alrededor de 10 géneros, entre los que destacan la *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta última la más estudiada en el caso de la fermentación en la industria vinatera. Sin embargo, el estudio a nivel laboratorio de otras levaduras como la *K. marxianus* y su posterior estudio a nivel industrial, logrando un escalamiento de la misma para lograr colonizar

los mostos se muestra como un reto interesante a la industria tequilera logrando características organolépticas especiales del producto debido a la generación de compuestos especiales que son separados durante el proceso de destilación obteniendo un producto que cumple con lo establecido por la NOM 006SCFI-2005.

Así el presente trabajo describe la metodología utilizada para incrementar las eficiencias en la fermentación a través del escalamiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus sp PE1* y su utilización a nivel industrial revisando la velocidad de fermentación y las eficiencias de producción de la misma en cuanto a la producción de tequila.

II.- REVISION DE LITERATURA

II.1 Las levaduras: definición y características generales

El descubrimiento de los microorganismos se asocia con el desarrollo del microscopio en el siglo XVII. La primera persona que los describió con ciertos detalles en 1680, fue el holandés Antonie Van Leeuwenhoek. A partir de entonces se empezó a desarrollar la microbiología (bacterias, levaduras y hongos), ciencia que tiene gran impacto en los procesos fermentativos.

El grupo de microorganismos conocido como levaduras se clasifica dentro del reino Fungí (hongos), y se definen como un hongo basidiomiceto o ascomiceto que se multiplica de manera vegetativa, principalmente por gemación ó fisión y que no presenta durante su fase sexual cuerpos fructíferos internos o externos. Comparado con otros grupos de microorganismos, algas, bacterias y protozoarios, las levaduras presentan comparativamente pocos géneros y especies. De manera muy general, los dos principales géneros de levaduras de interés comercial son *Candida* y *Saccharomyces*, (especialmente *Saccharomyces cerevisiae* y especies relacionadas con la panadería y la producción de alcohol) y tienen la especial virtud de que poseen una eficiente capacidad catabólica, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Kurtzman y Fell, 1998).

II.1.1 Crecimiento y división celular

La forma mas común de reproducción de levaduras es asexual o por gemación, también se puede observar fisión, seguida de formación de pared celular. El crecimiento de las levaduras se asocia casi completamente con el crecimiento de las gemas, las cuales alcanzan el tamaño de la célula madura al tiempo que se separa de la célula madre. Cuando las condiciones son favorables, las levaduras se reproducen rápidamente, ocupando la totalidad del ciclo celular. En la fermentación de bebidas alcohólicas la fase de crecimiento mas importante es la fase exponencial o logarítmica ya que es el momento en que la célula es metabólicamente más activa (Walker, 1998).

II.1.2 Estructura y funciones básicas de las levaduras

Las levaduras son células eucariotas y están rodeadas por una membrana plasmática y una pared celular particularmente resistente (Walker, 1998).

El funcionamiento del metabolismo celular de las levaduras tienen una serie de necesidades nutricionales donde los principales elementos que requieren las levaduras para llevar a cabo su metabolismo son los siguientes:

Los macronutrientes: C, H, O, N, P, K, Mg y S

Los micronutrientes: Ca, Co, Fe, Mn, Zn, Ni, Mo.

El funcionamiento celular de cada uno de estos compuestos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales necesidades de las levaduras y función celular de cada uno de ellos (Walker, 1998)

Elemento	Fuente Común	Función Celular
Carbono	Azúcares	Elemento principal de la estructura celular en combinación con H, O y N. Fuente de energía
Hidrógeno	Protones de medios ácidos	Mantiene el pH interno de la célula (entre 5 y 6). Intervención en los fenómenos de transporte a través de la membrana.
Oxígeno	Aire, O ₂	Sustrato de la respiración y productor de energía.
Nitrógeno	Urea, aminoácidos, NH ₄ ⁺	Funciones estructurales y funcionales como grupo amino en las proteínas y las enzimas.
Potasio	K ⁺	Balance iónico, actividad enzimática.
Magnesio	Mg ₂ ⁺	Actividad enzimática, estructura de la célula y de los organelos.
Azufre	Sulfatos, metionina	Aminoácidos y vitaminas
Calcio	Ca ₂ ⁺	Posible función en la transducción de señales en la célula

II.1.3 Distribución de las levaduras en el medio ambiente

Las levaduras han colonizado gran parte del planeta: se pueden aislar del aire, agua y tierra. Dependen de la presencia de una forma orgánica de fuente de carbono, por ejemplo: azúcares simples, ácidos orgánicos y grasos, alcoholes alifáticos, etc.

En el caso de la elaboración de bebidas alcohólicas, las levaduras provienen de dos hábitat diferentes: las materias primas (principalmente vegetales) y el entorno del lugar donde se procesa la bebida (Vaughan-Martini y Martín, 1995).

II.2 Levaduras fermentadoras

Dentro de las levaduras fermentadoras más importantes a nivel industrial se encuentra principalmente la *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta la más utilizada para la producción de bebidas alcohólicas. Actualmente se han identificado varias levaduras fermentadoras de mosto de pulque y aguamiel, entre estas levaduras se encuentran *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, y *Kluyveromyces marxianus* (Estrada-Godina *et al.*, 2001). En el caso específico del tequila existe solo un estudio publicado (Lachance, 1995) sobre una caracterización exhaustiva de las levaduras presentes en el proceso de elaboración de esta bebida. Este autor identificó al menos 10 géneros entre los que se encuentran las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* y *Kluyveromyces marxianus*. La presencia de tantas especies en la fermentación para la elaboración de tequila deja entrever la complejidad del proceso, ya que cada levadura tiene necesidades diferentes y sobre todo es susceptible de producir compuestos diferentes e importantes en el aroma final de la bebida (Lachance, 1995).

II.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la levadura más utilizada para la producción de bebidas alcohólicas. Esta levadura posee una serie de características deseables que permiten obtener propiedades específicas, tanto en el proceso como en el producto elaborado. Estas características son las siguientes:

- Propiedades fermentativas: inicio rápido de la fermentación alcohólica, elevada tolerancia al etanol (9% v/v), alta osmotolerancia; temperatura óptima baja (29°C), formación moderada de biomasa. El contenido de alcohol producido por esta levadura oscila entre 4 y 7% v/v dependiendo de la concentración inicial de azúcares.
- Propiedades aromáticas: formación moderada de compuestos azufrados y de alcoholes superiores, así como de ácidos orgánicos: liberación de precursores glicosilados de aromas, alta producción de glicerol, actividad hidrolítica, autólisis favorecida, actividad modificada de las esterasas, etc. (Pretorius 20

II.2.2 *Kluyveromyces marxianus*

La levadura *Kluyveromyces marxianus* fue identificada por primera vez en el año 1981 por Hanssen. Esta levadura es conocida por ser la responsable de la producción de compuestos aromáticos presentando características organolépticas a las bebidas destiladas, estos compuestos aromáticos incluyen esteres frutales, ácidos carboxílicos, ketonas, furanonas, hidrocarburos aromáticos, pero sobre todo es una excelente fermentadora de mostos de agave dando como resultado riquezas alcohólicas de entre 6 y 11% v/v de alcohol, dependiendo de la concentración inicial de azúcares y una resistencia al mismo de 12% (v/v) (A.R. Estrada-Godina, *et al*, 2001). Las fuentes de carbono requeridas para la producción de diversos compuestos son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Influencia de las diferentes fuentes de carbono en el crecimiento y producción de componentes aromáticos después de 24 horas de cultivo (Fabre *et al.*, 1998).

Sustrato 2 gr/l	Biomasa g/l	Feniletíl alcohol g/l	% de Consumo de fenilalanina
Glucosa	1.75	0.92	50
Etanol	0.7	0.315	17
Fructosa	1.9	0.73	40
Galactosa	3.3	0.79	43
Glicerol	0.35	0.12	6.5
Lactosa	1.63	0.76	41
Maltosa	0.5	0.085	4.5
Sacarosa	2.3	0.8	43
Xilosa	1.27	0.41	22

II.2.2.1 Factores que afectan el crecimiento de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

Los factores afectan la actividad y el crecimiento de esta levadura se muestran a continuación:

- Temperatura.
- pH.
- Concentración de sustrato.
- Concentración de producto.
- Oxígeno.
- Micronutrientes y macronutrientes.
- La presencia de sustancias tóxicas como el furfural e hidroximetilfurfural (Pretorius, 2000).

II.2.2.1.1 Furfural e Hidroximetilfurfural (HMF)

El HMF es uno de los compuestos formados por la degradación de productos azucarados, en particular por deshidratación de la fructosa (Lee, 1998).

Entre los efectos producidos por el furfural sobre la *K. marxianus* se encuentra: reducción de la tasa específica de crecimiento, disminución de la productividad volumétrica de etanol, descenso de la productividad específica de etanol, disminución de la producción de biomasa (Wittmann C., Hans M., Bluemke W., 2002).

Los efectos producidos por el HMF en los microorganismos son menores a los producidos por el furfural ya que la toxicidad de este compuesto es menor (Larsson, 2000; Taherzadeh *et al.*, 2000).

El efecto tóxico ocasionado por los furanos parece deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas ácidos nucleicos o bien producir daños sobre la membrana plasmática además, el furfural produce la inhibición de enzimas glicolíticos y fermentativos (M.M.W. Etschmann, D. Sell & J. Schrader, 2003).

II.3 Escalamiento de biomasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

Para lograr una buena fermentación de mostos de agave es necesario obtener grandes cantidades de biomasa de la levadura, la cual se utilizará como pie de levadura para aumentar la eficiencia de la fermentación.

Con la adición de levadura previamente desarrollada en un inóculo la fermentación puede tener una duración de 20 horas a tres días (Pinal *et al.*, 2000).

El escalamiento de la levadura a nivel laboratorio se puede llevar a cabo gracias al uso de biorreactores, el cual provee de todos los servicios necesarios para el cultivo, tales como mezclado, termostatación, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH, etc. El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial (Barrera, 2002). Por otra parte, cuando se habla de sistemas de cultivo o, también, métodos de cultivo, se hace referencia la modo de operar el biorreactor, esto es en forma de cultivo en lote, continuo y lote alimentado (Pirt Blackwel, 1975).

La biomasa obtenida se utilizada para la fermentación de mostos fermentables en la producción de etanol y compuestos aromáticos.



Fig. 1 Biorreactor de 4 litros de capacidad

II.4 Fermentación de mostos de agave

Para llevar a cabo la fermentación es necesario contar con mostos de agave fermentables, los cuales son obtenidos de piñas de agave que sufren una serie de procesos obteniendo un jugo rico en azúcares reductores, principalmente fructosa. Para llevar a cabo el proceso de producción de tequila las piñas de agave sufren una serie de procesos que se mencionan a continuación:

1. Cosecha de la piña de agave
2. Cocción de las piñas en hornos y autoclaves
3. Molienda de las piñas cocidas para la obtención de mostos fermentables
4. Fermentación de mostos

II.4.1 Cosecha de piñas de agave

La materia prima en la obtención de los mostos fermentables para la elaboración de tequila es la piña de agave, la cual es cultivada dentro de las zonas de denominación de origen (Guadalajara, Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas) y cosechada cuando esta alcanza la madurez sexual, es decir, de entre 8 y 10 años, la piña esta compuesta principalmente de agua 60%, inulina 24%, fibras 11%, azúcares reductores 1.5%, proteínas 0.02% y cenizas 2.7% (NOM 006-SCFI-2005).



Fig. 2. Cosecha de las piñas de agave



Fig. 3. Piña rasurada



Fig. 4. Piñas de agave listas para su cocción

II.4.2 Cocción de las piñas de agave

La principal razón de la cocción de las piñas para la producción de tequila es la hidrólisis de inulina para la obtención principalmente de fructosa, que posteriormente es fermentada (Cedeño 1995). Un mal proceso de cocimiento limitaría la cantidad de azúcar libre (Apriyanton, A.; Ames, J. M. 1993). Por el contrario, un cocimiento excesivo disminuiría la cantidad de azúcares disponibles. Las condiciones de cocción de la piña de agave son altas temperaturas, bajos pH (4.5), tiempo y la humedad son favorables para la reacción de Maillard (Mancilla-Margalli N.A y Lòpez G. Mercedes, 2002).

El proceso de cocción es realizado a través de hornos y autoclaves.

II.4.2.1 Hornos

Hornos tradicionales: operan a presión atmosférica, se usaron en siglos pasados en la industria del tequila. Tales hornos consisten en una cavidad de 6-12 metros de diámetro y 2-4 metros de profundidad. Por lo general, los hornos operan a presiones absolutas ligeramente arriba de la presión atmosférica y por tanto alcanzan temperaturas de apenas 70-90°C (Lamas Robles Roman, *et al.*, 2004) El cocimiento en hornos es lento y dura de 24 a 48 horas, pasado este tiempo se libera el vapor y se deja el agave dentro del horno cerrado por alrededor de 20-30 horas más para completar el cocimiento (López, 2001).

II.4.2.2 Autoclaves

La tendencia actual de las grandes empresas con grandes volúmenes de producción de tequila es de realzar el cocimiento con vapor de agua en autoclaves verticales u hornos horizontales de uno o dos puertas, debido a las ventajas que ofrecen:

- Reducción del tiempo de cocimiento y del consumo de vapor.
- Control de la temperatura y la presión que permite un cocimiento más homogéneo y estandarizado.
- Mayor facilidad de carga y descarga (Lamas Robles Roman, *et al.*, 2004)



Figura 5. Autoclave Empresa Embajador Jalisciense



Figura 6. Acomodo de las piñas dentro de la autoclave



Fig. 7. Piñas de agave antes de ser sometidas al proceso de cocción



Fig. 8. Piñas de agave sometidas al proceso de cocción

II.4.3 Condiciones y etapas del cocimiento en la autoclave

Las presiones utilizadas durante el cocimiento oscilan entre 0.5 y 1.4 Kg./cm² y los tiempos de cocción entre 12 y 24 horas; estos tiempos dependen de una serie de factores, principalmente el tamaño y acomodo de las piñas, la presión del vapor que se alimenta y la cantidad de agave.

El cocimiento se puede dividir en 5 etapas:

1. Carga de autoclave.
2. Calentamiento hasta alcanzar la presión de operación.
3. Sostenimiento de la presión de operación.
4. Enfriamiento.
5. Descarga del autoclave (Castro, 2003).

II.4.3.1 Cambios fisicoquímicos durante el cocimiento del agave

El cocimiento del agave ablanda la textura del agave facilitando su molienda. Ello se debe a diversos factores como la pérdida de turgencia, de aire vascular y extracelular y a la desnaturalización y degradación de los componentes de la membrana celular y de otros polisacáridos.

En las tres primeras horas del cocimiento se generan las mieles amargas, que son desechadas por su bajo contenido en azúcares reductores y por contener los agentes que propician la formación de metanol, además de ceras de la cutícula del agave y otras impurezas que pueden dar un sabor desagradable al jugo. Posteriormente al desalojo de las mieles amargas se generan durante el cocimiento las mieles dulces, que son el producto de la hidrólisis de la inulina contenida en el agave, las cuales se recolectan a fin de llevar a cabo la fermentación, realzar la determinación de azúcares reductores y conocer el momento en que terminó la hidrólisis. En un proceso típico, se generan aproximadamente 0.018 Kg. de mieles amargas y 0.193 Kg. de mieles dulces por cada Kg. de agave crudo (Castro, 2003).

II.4.3.2 Color en jugo de agave

El color del agave sufre un cambio a un color mas oscuro durante el proceso de cocción (López; Mancilla, 2000). El color café característico de las piñas después de la cocción esta directamente relacionado con la reacción de Maillard, basado en la generación de componentes tales como furfural, 5-hidroximetil-furfural y pre-melanoides, aunque los carotenoides son otro pigmento que puede contribuir con el color café. En la tabla 2 se muestran los diferentes compuestos formados durante el proceso de cocción de agave.

Tabla 3. Componentes importantes formados durante el proceso de cocción de las piñas de agave tequilana weber var. Azul. (Mancilla, López, 2002)

compound	KP ^b (t _R)	4 h	12 h	20 h	28 h	compound	KP ^b (t _R)	4 h	12 h	20 h	28 h
alcohols						organic acids					
1-butanol	(6.11)		0.37	0.43	0.23	acetic	200	14.03	6.13	22.82	2.60
3-methyl-1-butanol	(6.87)	0.42	1.35			propanoic	300	3.14	1.24	1.65	0.81
1-hexanol	(9.16)	0.41	0.88	0.82	0.95	butanoic	400	15.25	6.96	7.27	5.42
1-octen-3-ol	(10.85)		0.75	0.86	0.49	pentanoic	500	10.04	2.12	5.63	2.33
1,2-butanediol	345	6.14	1.18	1.97	1.04	hexanoic	600	6.30	4.66	13.03	5.38
1,3-butanediol	365	1.41	1.18	0.93	0.77	heptanoic	700	9.09	4.96	1.86	3.76
1,2-ethanediol	405	5.83	2.86	4.76	4.36	octanoic	800	9.65	3.10	8.17	7.02
benzyl alcohol	635	6.64	2.60	4.28	3.78	nonanoic	900	9.79	3.13	2.59	2.42
phenylethyl alcohol	666	14.70	3.73	6.26	4.58	decanoic	1000			12.03	
3-methylphenol	826		3.33	2.59	6.48	benzoic	1165	8.31	2.26	8.28	5.62
aldehydes						dodecanoic	1200	11.25	6.09	5.30	17.42
benzaldehyde	294		0.36	2.81		benzeneacetic	1304	13.11	5.49	41.61	12.81
phenylacetaldehyde	420		1.94		3.85	tetradecanoic	1400	36.78	11.73	13.92	20.06
vanillin	1186	19.08	17.73	23.82	16.15	pentadecanoic	1500	1.36	4.85	12.55	12.89
syringaldehyde	1656	5.98	11.72	17.81	17.05	3-phenyl-2-propanoic	1560	12.75	19.59	5.36	14.48
4-hydroxybenzaldehyde	1657	18.38	14.04	19.98	14.49	hexadecanoic	1600	5.01	32.23	73.72	86.28
amino acids and derivatives						heptadecanoic	1700	10.65		8.56	16.98
<i>N</i> -acetylalanine	(5.00)	1.00				octadecanoic	1800	5.98	17.41	43.46	50.18
furans						oleic	(59.56)	35.23	15.93	18.39	33.93
tetrahydro-2-methylfuran	(6.61)	0.18	0.24	0.18	0.44	pyrans					
5-ethenyltetrahydro- α,α -5-trimethyl-2-furanmethanol	(10.74)	0.93	1.79	1.65	3.53	2,3-dihydro-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	287			2.19	1.91
furfural	230	6.90	6.42	11.02	14.87	maltol	718	9.38	7.08	26.01	7.59
1-(2-furanyl)ethanone	275	1.72	1.94	5.49	2.50	2,3-dihydroxy-3,5-dihydro-6-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	999	25.18	22.23	17.29	72.67
5-methylfurfural	351				3.87	2,3-dihydro-2-methyl-4(<i>H</i>)-pyran-4-one	1022	17.40	5.55	58.87	13.09
2-furanmethanol	437		7.89	15.34	16.27	sulfur compounds					
2-furancarboxylic acid	710		1.23	7.38	1.88	4-methylthiazole	359	0.61		0.71	
methyl-2-furoate	756	16.67	10.88	12.20	54.09	2,3-dimethylthiophene	809	9.77			
5-(hydroxymethyl)furfural	1139	106.7	54.72	816.01	522.80	2,3-dihydrothiophene	845			7.84	
furanones						2,4,5-trimethylthiazole	1436		1.61		
dihydro-2-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	(7.81)		0.59	0.63	2.11	4,5-dimethyl-2-propylthiazole	1438				7.07
dihydro-5-methyl-2(3 <i>H</i>)-furanone	393		1.53	2.04	0.77	2-cyclopropylthiophene	(59.61)		4.06		
3-methyl-2(5 <i>H</i>)-furanone	491			2.13	1.56	terpenes					
2(5 <i>H</i>)-furanone	528	5.01	1.39	6.26	2.68	linalool	305	19.15	31.18	8.24	24.19
ketones						linalyl propanoate	462	16.11	12.89	9.01	16.92
3-hydroxy-2-butanone	(8.25)	29.95	9.21	3.01	2.83	(<i>Z</i>)-geraniol	561	5.52	5.99	3.28	3.78
1-hydroxy-2-propanone	(8.55)	4.23	3.09	3.52	4.05	(<i>E</i>)-geraniol	606	9.71	14.46	3.81	3.54
butyrolactone	414	3.72	3.49	6.44	4.68	phytol	734	8.32	6.24	15.01	8.25
cyclotene	589	8.28	4.62	12.32	3.77	1-hydroxylinalool	1070	22.77	14.34	15.91	10.81
β -damascenone	1273		1.97			squalene	1738	25.06	4.93	8.27	21.07
nitrogen compounds											
pyridine	(6.92)	5.95	16.11	4.84	6.44						
2-hydroxypyridine	695			3.46	0.71						
1 <i>H</i> -pyrrole-2-carboxaldehyde	756			12.19	54.08						
2-pyrrolidinone	791				6.72						
4-ethyl-2-methylpyrrole	1171		4.04		6.97						
3,4-diethyl-2-methylpyrrole	1683	13.72									
2-methoxy-5-(2-methylpropyl)-pyrazine	1762		4.32								

II.4.4 Molienda de las piñas de agave

En la molienda se extrae el jugo de los agaves cocidos conteniendo los azúcares que serán transformados en etanol. El ablandamiento de las piñas de agave cocidas facilita su desintegración rompiendo los tejidos del agave para que los azúcares puedan transferirse con facilidad al agua caliente que es agregada al bagazo de agave obtenido durante el proceso de desintegración de las piñas obteniendo un mosto de 10-12°Bx (Javier Arrizon, *et al.*, 2005).



**Fig. 9. Desgarradora de la
fábrica Sauza**



**Fig. 10. Desgarradora de la fábrica
Embajador Jalisciense**

II.4.5 Fermentación de mostos de agave a través de la levadura *Kluyveromyces marxianus* se PE1

La fermentación consiste en la transformación de los azúcares en alcohol etílico y otros compuestos en cantidades menores pero que pueden jugar un papel importante en las características del producto final. Esta transformación es realizada por medio de la adición de pie de levadura *K. marxianus* a los mostos fermentables, la fermentación consta de tres etapas principales: el transporte de azúcares al interior de la célula, la transformación de los azúcares a piruvato por medio de la glucólisis y finalmente la conversión de piruvato a etanol. Durante la glucólisis y/o fructosa en la fermentación de jugos de agave cada molécula de glucosa se convierte en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono. La conversión teórica de 180 gramos de azúcar en 92 g de etanol (51.1%) y 88 gramos de dióxido de carbono (48.9%) se puede obtener únicamente en ausencia de crecimiento, de producción de otros

metabolitos y pérdidas de etanol debido a la evaporación. En una fermentación modelo, en condiciones óptimas, cerca del 95% de los azúcares se convierten en alcohol y dióxido de carbono, 1% en biomasa y 4% en otros productos como glicerol. La velocidad de fermentación depende de diferentes factores, como la composición del mosto, las condiciones de operación (fermentación con o sin bagazo), temperatura, pH, pero sobre todo la cepa utilizada, (Gschaedler Mathis A. C.; *et al.*, 2004).



Fig. 11. Mosto fermentable



Fig. 12. Mosto fermentado

II.4.5.1 Equipo necesario para llevar a cabo la fermentación

El equipamiento para llevar a cabo la fermentación es relativamente sencillo la cual se lleva a cabo en tanques por lo general abiertos con volumen variables. Los cuales pueden ser de madera, plástico, concreto o azulejo, aunque actualmente la mayoría de la tequileras están optando por el acero inoxidable. Casi todos los tanques son abiertos lo que contribuye a generar pérdidas de alcohol y de compuestos volátiles por evaporación (Cedeño y Alvarez- Jacobs, 2000). Estos tanques son mostrados en la figura 9.



**Fig. 13 .Tanques de acero inoxidable con un volumen de 15,000 litros
Fábrica Embajador Jalisciense**



Fig. 14. Tanques de madera Fábrica Sauza

II.4.5.2 Compuestos volátiles generados durante la fermentación de mostos

En las bebidas alcohólicas la mayoría de los compuestos volátiles que contribuyen al aroma están directamente ligados con el metabolismo de la levadura (Wang, *et al.*, 2003).

Los compuestos generados durante esta fase son los siguientes:

- Alcoholes superiores
- Carbonilos (aldehídos y ésteres)
- Ácidos orgánicos y grasos

II.4.5.2.1 Alcoholes superiores

Se consideran superiores a los alcoholes con más de dos átomos de carbono (quedan fuera de esta categoría metanol y etanol). Los principales alcoholes superiores presentes en las bebidas alcohólicas son el propanol, n-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y feniletanol.

Las levaduras sintetizan los alcoholes por medio de una descarboxilación de los cetoácidos seguida por una reducción del aldehído al alcohol correspondiente. Los cetoácidos se producen por dos vías: catabólica a partir de los aminoácidos del medio de cultivo o vía anabólica a partir de los azúcares del medio (Romano *et al.*, 2003).

II.4.5.2.2 Carbonilos

Los carbonilos agrupan tres grandes familias de compuestos:

- Los aldehídos: estos se forman principalmente durante la fase fermentativa debido a la descarboxilación de los cetoácidos, la mayor producción de aldehídos ocurre durante la fase más activa de la fermentación (Benn y Peppard, 1996; Hofmann, T.; Munich, P.; Schieberle, P. 2000).
- Cetonas: las cetonas presentes en las bebidas alcohólicas son principalmente dicetonas. Se forman por una descarboxilación oxidativa de ácidos acetohidróxidos que excretan las levaduras. Las cetonas en general se forman únicamente por el catabolismo de los aminoácidos.

- **Acetales:** los aldehídos son compuestos muy reactivos que pueden reaccionar con alcoholes y producir acetales. Estos compuestos están formados por dos moléculas de alcohol y los acetales pueden hidrolizarse y original alcoholes y aldehídos.
- **Esteres:** los principales esterres presentes en las bebidas alcohólicas se forman gracias a las levaduras mediante una esterificación enzimática entre los alcoholes libres y los ácidos carboxílicos en forma activa. Estas reacciones forman parte del metabolismo secundario de las levaduras. En el caso del tequila se han identificado la presencia de 47 ésteres siendo el más abundante el acetato de etilo, seguido por el acetato de isoamílico y el pentaonato de etilo, los cuales se caracterizan por sabores y olores afrutados y umbrales de detección muy bajos. Por tanto, juegan un papel muy importante en las características aromáticas del producto final. Los factores que influyen en la formación de estrés son múltiples; destaca la levadura utilizada debido a la relación directa que se tiene en la formación de alcoholes. Otro factor importante es la composición del medio de cultivo, en particular la relación carbono/nitrógeno. Al realizar un seguimiento de la formación de los esterres en el transcurso de la fermentación, la gran mayoría se produce en las fases finales. El crecimiento de la levadura con aeración adecuada puede suprimir totalmente la formación de esterres (Berry y Watson, 1987).

II.4.5.2.3 Ácidos grasos

- En las bebidas alcohólicas se han identificado más de 100 ácidos grasos. Algunos de los ácidos orgánicos (acetato, malato, succinato, citrato) derivan del metabolismo intermediario, de la vía del ácido pirúvico. Como todos los ácidos orgánicos proviene del metabolismo de la fuente de carbono, su acumulación depende básicamente de la velocidad de la fermentación: una rápida fermentación favorece la acumulación de estos compuestos mientras, que una lenta fermentación estimula su asimilación y por ende su ausencia en el producto final (Berry y Watson, 1987).

II.4.5.2.4 Metanol

El metanol está presente en todas las bebidas fermentadas. Proviene en gran parte de la demetilación de pectinas, debido a la acción de la pectin-metilesterasa en el curso de la fermentación. En el proceso de elaboración del tequila se considera que esta transformación pueda presentarse también durante el cocimiento de las piñas de agave. Las concentraciones de metanol en un destilado dependen, en principio, de la cantidad de metanol inicial presente que se tenga en el mosto y el ordinario, y del punto o momento en el que se realice el corte de colas (Paine, A; Davan, A. D. 2001; Prado, 2002).

Las sustancias antes mencionadas son recuperadas tras un proceso de destilación.

II.5 Destilación

La separación de una mezcla líquida homogénea en sus componentes individuales es un paso importante en muchos procesos de elaboración de bebidas alcohólicas (Prado, 2004). Uno de los métodos posibles para separar los componentes de una mezcla es la destilación la cual utiliza un principio sencillo: se crea un íntimo contacto entre la mezcla inicial (líquida) y una de segunda fase (vapor) para realizar una efectiva transferencia de masa entre ambas. Las bebidas alcohólicas fermentadas pueden destilarse siguiendo tres esquemas: en continuo, por lotes y en régimen mixto (continuo por lotes). Las técnicas de destilación son: destilación diferencial, destilación en columna continua y destilación fraccionada por lotes.

II.5.1 Partes que componen un alambique

Los alambiques utilizados en la destilación de mosto fermentado y ordinario constan de las siguientes partes.

- a) Olla o hervidor. Aquí se realiza la ebullición y el desprendimiento de los vapores de los componentes de la mezcla que se destila. En el fondo del hervidor se encuentra un serpentín de calentamiento, por cuya pared se transmite el calor del vapor proveniente del generador al mosto fermentado o al ordinario.

- b) Capitel. Se localiza arriba de la olla o hervidor. Su forma y volumen determinan la concentración, selección y separación de los diferentes componentes volátiles.
- c) Cuello de cisne. Esta parte del alambique se fabrica de forma curva o recta y sirve para conducir los vapores al serpentín de condensador.
- d) Condensador. Al condensador o resfrió lo componen varias partes: la lenteja, que actúa como una cámara de condensación en la que los vapores alcohólicos cambian a la fase líquida; el serpentín, en el que concluye la condensación de vapores alcohólicos y se reduce la temperatura del líquido recién condensado hasta una cercana a la del agua empleada en el sistema que proviene de la torre de enfriamiento.



**Fig. 15 Alambique fábrica
Sauza**



**Fig. 16 Alambique fábrica Embajador
Jalisciense**

II.5.2 Factores que influyen en la eficiencia de los alambiques

Si definimos la eficiencia de un alambique por la cantidad de alcohol puro que se obtiene respecto del que se alimenta a la olla del alambique, se pueden listar los siguientes factores que la afectan:

- Volumen de cabezas separado.
- Grado alcohólico de las cabezas

- Volumen de corazón destilado
- Grado alcohólico del volumen de corazón
- Volumen de colas
- Grado alcohólico de colas
- Temperatura del agua del lote condensador
- Tiempo en que se destila un lote de mosto fermentado o de ordinario.

La eficiencia del alambique, se estima utilizando el volumen de alcohol 100% puro calculado con los datos del grado alcohólico y el volumen de cada fracción destilada, de la siguiente manera:

(Etanol en cabezas + etanol en corazón + etanol en colas) (100) / (etanol en mosto fermentado) y, para la rectificación:

(Etanol en cabezas + Etanol en corazón + Etanol en colas)/(100)/ etanol ordinario.

Una eficiencia mayor al 97% se considera aceptable, y eficiencias por debajo de tal valor es un indicador de que existe alguno de los siguientes problemas:

- Insuficiente capacidad en el sistema de agua de enfriamiento
- Destilación demasiado rápida
- Temperatura del agua de enfriamiento demasiado alta (superior a los 25°C)

II.5.3 Destilación diferencial

La destilación diferencial es la más utilizada en la industria tequilera, esta destilación consta de dos etapas: destrozado y rectificación. Entre los factores relevantes en una destilación diferencial destacan las características del mosto fermentado (su riqueza alcohólica, el perfil de compuestos aromáticos) y el programa de cortes de cabeza y colas.

II.5.3.1 Destrozado

El objetivo es obtener un destilado llamado ordinario con un grado de alcohol que oscila del 20 al 30% alcohol en volumen donde la fracción destilada llamada cabeza, usualmente es de 13 a 16 litros el cual es reciclado hacia el

mosto fermentado, en esta etapa se separan compuestos de bajo punto de ebullición, como metanol, acetaldehído y acetato de etilo. Los alcoholes superiores 1-propanol, 2-propanol, isopropanol, 1-butanol, isobutanol, alcohol amílico destilan en las cabezas y en la primera parte del corazón. En la fracción destilada llamada cola se separan alcoholes menos volátiles como ácido acético, lactato de etilo, furfural y algunos ésteres. El proceso de destrozamiento se realiza hasta que la corriente de destilado presente un grado alcohólico de 8 a 10% en volumen (Prado, 2004), obteniendo el ordinario (Prado-Ramírez, *et al.*, 2005) Los puntos de ebullición y fusión de los compuestos destilados son marcados en la Tabla 4.

Rectificación

La finalidad de la rectificación es aumentar la concentración alcohólica del ordinario y obtener un destilado (corazón) con un grado alcohólico que oscila del 38 hasta el 65% etanol volumen. En esta etapa se separa una fracción inicial del destilado o cabeza. Esta fracción posee un alto grado alcohólico, del orden del 70% etanol volumen. La corriente que continúa destilando corresponde a la fracción de corazón o producto y se considera que es la parte más rica de congéneres. El corte de esta fracción se realiza cuando el destilado acumulado posee el grado alcohólico predeterminado, el cual es de 55% alcohol/volumen (CRT, 2000).

Tabla 4. Punto de ebullición de los compuestos separados en el proceso de destilación

Compuesto	Punto de ebullición
Acetaldehído	20
Metanol	64.5
Acetato de etilo	77
Etanol	78.3
Isopropanol	82.5
n-propanol	97
Acido acético	118
Alcohol amílico	128
Furfural	162
n-butanol	180

Compuestos destilados regulados por la Norma Oficial Mexicana 006SCFI-2005

Durante el proceso de destrozado y rectificación del tequila, se identifica una gran variedad de compuestos aromáticos que influyen en el aroma y sabor del tequila. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 006SCFI-2005 establece la concentración de cada uno en el tequila blanco, estos datos son mostrados en la Tabla No.5.

Tabla 5. Concentración de congéneres que la NOM-006SCFI-2005 establece para tequilas blancos.

Parámetro	Compuestos referido	Concentración mg/ml referido a alcohol anhidro	
		Mínimo	Máximo
Alcoholes superiores	1-Propanol, 2-butanol, Isobutanol, 1-butanol, alcohol isoamílico, 1-pentanol	20	400
Metanol	Metanol	30	300
Aldehídos	Acetaldehído	0	40
Esteres	Acetato de etilo, Lactato de etilo.	2	270
Furfural	Furfural	0	1

Tipos y categorías de tequilas

El tequila es un líquido transparente con color y olor característico, según su tipo puede ser incoloro o amarillento cuando se madura en recipientes de roble o encino, o bien cuando es aboca sin madurarlo (NOM-006-SCFI-2005). Dentro de estas variantes el tequila se clasifica, de acuerdo con sus características, en:

- Tequila blanco. Producto destilado que se obtiene directamente de la rectificación, solo se ajusta la gradación alcohólica.
- Tequila joven u oro. Tequila blanco abocado, de acuerdo con la Norma Oficial del tequila, el abocado es el procedimiento para suavizar el sabor

del tequila mediante la adición de ingredientes como el color caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina y jarabe basado en azúcar.

- Tequila reposado. Producto que permanece por lo menos dos meses en barricas de madera de roble o encino.
- Tequila añejo. Producto sujeto a un proceso de maduración por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros (NOM-006-SCFI-1994).



Fig. 17 Barricas de roble blanco

Justificación

El tequila producido en nuestro país se ha comercializado a nivel mundial, considerando a este como una bebida de sabor fuerte y olor característico. El paso clave para la producción de esta bebida es la fermentación, donde se utiliza microorganismos capaces de fermentar concentraciones de entre 12 y 18°Bx.

En la actualidad la mayoría de las empresas productoras de esta bebida utilizan la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obteniéndose un contenido de alcohol entre 4 y 9 dependiendo de la concentración de azúcares utilizados.

Sin embargo, el uso de una levadura diferente a la *Saccharomyces cerevisiae*, seleccionada del mismo mosto de agave e identificada perfectamente se muestra como una opción interesante ya que aportaría características organolépticas especiales, también muestra un fuerte impacto ya que disminuye pérdidas ligadas al proceso de fermentación.

Para lograr un producto como el Tequila utilizando levadura diferente a la *Saccharomyces cerevisiae* y poder determinar su capacidad fermentativa nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La elaboración de tequila conlleva una serie de procesos importantes siendo la fermentación la etapa clave para la elaboración de esta bebida, en esta etapa se utilizan microorganismos vivos, principalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizar otras levaduras fermentadoras como la *Kluyveromyces marxianus* sp PE1, aislada de los mostos de agave, muestra capacidad fermentativa elevada con riquezas alcohólicas de entre 6 y 7.5 v/v alcohol y características organolépticas especiales.

Objetivos

- Obtención de grandes cantidades de biomasa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* sp PE1 por medio del escalamiento hasta obtener la cantidad necesaria de pie para la inoculación de mostos de agave.
- Determinar capacidad fermentativa de la levadura *Kluyveromyces marxianus* sp PE1 en mostos de agave a nivel industrial.

MATERIALES Y METODOS

Escalamiento de biomasa levadura *Kluyveromyces marxianus sp PE1*

La levadura *Kluyveromyces marxianus* fue aislada de mosto de agave, este aislamiento se realizó en el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

1. Primera etapa de la obtención de biomasa

Una vez aislada la levadura, esta se inoculó en 5 ml en jugo de agave estéril a una concentración de azúcares de 3°Bx, se agregó sulfato de amonio 250 g/l. El tubo se introdujo en la incubadora bajo las siguientes condiciones:

- 30°C de Temperatura
- 150 rpm
- 18 horas de incubación

Transcurrido este tiempo se realizó un conteo celular, viabilidad y se realizó tinción Gram.

- Para realizar el conteo celular se utiliza la cámara de Neubauer tomando en cuenta los siguientes puntos:
 1. Si la levadura está justamente en la raya del centro, esta levadura no se cuenta.
 2. Si una levadura madre está gemando a una hija pequeña, ambas se cuentan como una sola.
 3. Si una levadura madre está gemando a una hija del mismo tamaño, se cuentan como dos levaduras.
 4. Si una levadura está gemando a varias hijas pequeñas, se cuenta como una sola.

Para determinar la población celular se utiliza la siguiente formula:

$$X = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times D \times (1/4 \times 10^6)$$

D= Dilución de la muestra.

Nota: para verificar la pureza del cultivo se realizó tinción Gram

Viabilidad: esta prueba se realiza mezclando 50µl de Azul de Tripano al 0.4% y 50µl del cultivo a probar, se dejó reposar por 5 minutos y se observa al microscopio.

Realizadas estas pruebas se procedió a transferir el cultivo a un matraz de fermentación con 500 ml de jugo de agave a 3°Bx y sulfato de amonio 250 g/l, las condiciones del crecimiento fueron: temperatura 30°C, tiempo de fermentación de 18 horas y 150 rpm.

Segunda etapa, cultivo en biorreactor

Al término de la fermentación en el matraz de fermentación y una vez realizadas las pruebas de conteo celular y viabilidad, la levadura se transfiere al biorreactor de 4 litros de capacidad este se esterilizó previamente con vapor circulante a 120°C durante 25 minutos. En el biorreactor se colocaron 3.5 litros de jugo de agave estéril a 3°Bx, sulfato de amonio 25 g/l y 125 ml de la levadura previamente obtenida con un total de células de 155×10^6 con un 100% de viabilidad, las condiciones de fermentación en el biorreactor fueron:

- pO₂ 5 Bar
- Temperatura 35°C
- RPM 200
- Aire 3 litros/minuto
- No se utilizó antiespumante

Producción de biomasa en cultivo de lote alimentado

Se monitoreo el crecimiento de la levadura *K. marxianus* sp PE1 hasta obtener un número constante de células por mililitro, enseguida se comenzó a adicionar jugo de agave estéril por medio de conductos, la velocidad de entrada del jugo de agave fue de 440 ml por hora, se siguió monitoreando la cantidad de células, después de 1 hora de adicionar jugo de agave estéril se comenzó a recolectar la levadura a través de un conducto de salida, la cantidad de muestra que se recolecto fue de 440 ml por hora. La fermentación duro 3 días. La cantidad de

pie de levadura que se obtuvo fue de 20 litros con un total de biomasa celular de $155 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ y una viabilidad del 95%.

Escalamiento de biomasa de la levadura a nivel industrial.

- Se continua con el escalamiento de biomasa de la levadura, pero ahora a nivel industrial, el primer paso dentro de la industria es adicionar los 20 litros de pie de levadura que se produjeron a nivel laboratorio a un tanque que contiene 400 litros de jugo de agave, este jugo contiene una concentración de 5°Bx, 80 gramos de Urea y 8 gramos de bifloruro de amonio. Debido a que el tanque no tiene un sistema de agitación, aireación y control de temperatura se optó por introducir una manguera para airear el sistema, con respecto a la temperatura esta no se controló, por lo que se dejó que la levadura crezca a temperatura ambiente (20-30°C).
- Después de 24 horas de crecimiento la levadura se transfirió a otro tanque que contiene 5000 litros de jugo a 5°Bx, 1 Kg. de urea y 100 gramos de bifloruro de amonio, este se agregó después de 8 horas de la inoculación. Este pie de levadura se utilizó en la fermentación de mostos para la obtención de tequila. Para obtener los mostos fermentables las piñas de agave sufren los siguientes procesos:

Cosecha de piñas de agave

Cocción de las piñas de agave

Para el proceso de cocción se utilizaron 3 autoclaves y 2 hornos.

El tiempo de cocción en autoclave es alrededor de 35 horas, este tiempo se cuenta desde el momento de ingresar las piñas hasta su salida. La temperatura a la cual se cose en autoclave es de 100°C.

El tiempo de cocción de las piñas en los hornos tiene una duración de 50 horas.

Molienda de las piñas de agave cocidas

Una vez terminado el proceso de cocción se trasladan las piñas a la desgarradora, la cual tiene varios pasos.

1. Destrozado de la piña añadiendo agua o jugo diluido.

Para verificar que se tuviera un buen proceso de molienda se tomo 1 Kg. de bagazo con humedad y se diluyó en 4.5 litros de agua caliente a 50°C durante 30 minutos. Se tomo una muestra para determinar azúcares residuales, para realizar esta medición se utilizó HPLC.

Fermentación de mosto

Durante este proceso se adicionaron 12,000 litros de mosto, 10% de pie de levadura, 2.5 Kg. de Urea y 240 gramos de bicloruro de amonio.

Una vez adicionada la levadura se realizó un conteo de células, consumo de azúcares, producción de etanol y viabilidad, estas pruebas se realizaron hasta el termino de la fermentación. Para identificar el consumo de azúcares y producción de etanol se utilizó el HPLC

Destilación

- Destrozado: Durante este proceso se colocaron 3300 litros de mosto fermentado en alambiques, los cuales fueron calentados a más de 100°C a 1 libra de presión, transcurrido un lapso de 1 hora se rompe presión y se comienza el destrozado, en este paso se retiran 15 litros de destilado llamado cabeza, el cual se regresa a mosto para ser nuevamente destilado y obtener la mayor concentración de alcoholes, enseguida se continua con la destilación hasta la obtención de un porcentaje de alcohol de entre 10-8% y se desechan las colas junto con las vinazas. A este destilado se le denomina ordinario.
- Rectificado: se realiza una nueva destilación del ordinario, la primera fracción llamada cabezas se desecha, esto es de 15 litros aproximadamente (la concentración de alcohol es de 70%), enseguida se recupera corazón, el cual tiene una concentración de 65-38 de alcohol en volumen y se desecha colas (estas contiene una concentración menor de alcohol).

Análisis del tequila producido

Una vez obtenido el producto, que en este caso es el tequila, se realizó una huella cromatográfica para identificar sus componentes. Esto se realizó primeramente colocando 5 mililitros de tequila en un matraz de separación, enseguida se agregó por 3 ocasiones 5 ml de diclorometano.

El siguiente paso es concentrar esta muestra, esto se realizó a una temperatura de 70°C hasta obtener una concentración final de 2 µl. Obtenida este volumen se procede a su análisis en la GC-MS.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

El tequila es una bebida obtenida de la destilación de mostos de *Agave Tequilana Weber var. azul* fermentados por levaduras. Para la obtención de esta bebida es necesario que las piñas de agave sufran una serie de procesos, los cuales son: la cosecha de las piñas de agave cuando estas tienen de 8 a 10 años de edad, enseguida estas piñas se cosen para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores, para poder extraerlos se procede a la molienda de las piñas para obtener el mosto fermentable con cierta concentración de azúcares, este es el paso más importante en la producción del tequila ya que intervienen microorganismos, los cuales tienen la capacidad de transformar los azúcares presentes en etanol y otros compuestos aromáticos, los cuales le confieren al tequila las características aromáticas especiales. Para la obtención de estos compuestos se realiza el proceso de destilación hasta la obtención del producto, en este caso el tequila.

VII.1 Crecimiento de la levadura *K. marxianus* sp PE1 en biorreactor y tanques de acero

El crecimiento de la levadura *K. marxianus* sp PE1 en biorreactor muestra tiempos cortos de crecimiento (2 a 4 horas). Tanto en biorreactor como en los tanques de acero la biomasa alcanza su máximo pico a las 4 horas y luego permanece constante hasta las 21 horas de crecimiento (Fig. 18). En ambos casos se identifica una diferencia en la cantidad de biomasa, esta variación es debido a las condiciones de crecimiento en ambos casos, En el biorreactor se mantiene el cultivo con temperatura, aireación, movimiento constante y como es un sistema cerrado se obtiene un cultivo puro, en los tanques de acero se carece de tales condiciones, lo que provoca una disminución en la cantidad de biomasa, además los tanques de acero son abiertos lo que provoca una contaminación por bacterias (*Lactobacillus*) u otro tipo de levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* (Cedeño y Alvarez-Jacobs, 2000). Sin embargo, la contaminación por otro tipo de microorganismos es en un 1-2% ya que al lograr un escalamiento de un cultivo puro a un tanque provocamos una colonización, por lo que podemos obtener una mayor cantidad de la levadura *K. marxianus* sp PE1.

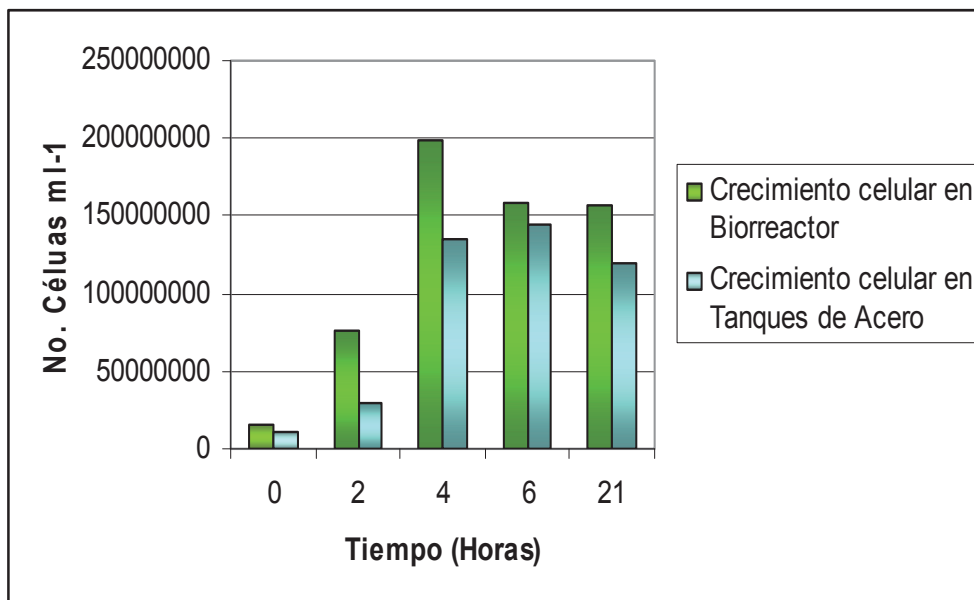


Fig. 18 Curva de Crecimiento de la levadura *K. marxianus* sp PE1 en biorreactor y tanques de acero

VII.2 Producción de etanol a través de la levadura *K. marxianus* sp PE1

La fermentación de mostos de agave se realizó durante 90 horas de fermentación. Esta fermentación comenzó de manera rápida manteniéndose así durante todo el tiempo de la fermentación. El consumo de glucosa se realizó durante las primeras 12 horas, sin embargo el consumo de fructosa se mantiene constante durante las 90 horas, observándose el máximo consumo durante las 72 horas obteniendo una concentración de 7.447% v/v de etanol (Fig. 19). Sin embargo a las 90 horas de fermentación se observa una disminución en la concentración de etanol y un consumo del 100% de fructosa (Tabla 6). Esta disminución en la concentración de etanol puede ser debido a la evaporación del etanol, ya que los tanques de fermentación son abiertos, lo que provoca una pérdida por evaporación, otra causa de esta disminución puede ser debido a la transformación del etanol en ácido acético, por medio de bacterias o la conversión de este en diversos componentes, principalmente ésteres (Gschaedler, *et al.* 2000).

Estos resultados confirman que tras llevar a cabo un proceso de escalamiento de una levadura aislada de mostos de agave se reducen los tiempos de fermentación a 72 horas; contrario a lo que pasa con la fermentación de mostos a los cuales no se les inocula con levaduras aisladas de mostos o levaduras

que no son propias para la fermentación, en este caso las levaduras de pan, por lo que la fermentación se extiende hasta las 90 horas o inclusive más tiempo (Pinal *et al.*, 2000).

Tabla 6. Consumo de azúcares reductores y transformación de estos en etanol por la levadura *K. marxianus* sp PE1 en 90 horas de fermentación.

	Tiempo cero	12 Horas de fermentación	42 horas de fermentación	72 horas de fermentación	90 horas de fermentación
Sacarosa	0.537% p/v	0.3773% p/v	1.016% p/v	0.626% p/v	0.66% p/v
Glucosa	1.103% p/v	0.0000	0.000	0.000	0.000
Fructosa	9.145% p/v	2.66% p/v	0.699% p/v	0.333% p/v	0.000
Etanol	0	3.53 v/v	7.34 v/v	7.447 v/v	6.87 v/v

VII.3 Riqueza alcohólica producida por la levadura *K. marxianus* sp PE1 y la *Saccharomyces cerevisiae*.

La riqueza alcohólica producida durante la fermentación de mostos indican la capacidad de la levadura en transformar los azúcares reductores en etanol y otros compuestos. En una fermentación modelo, cerca del 95% de los azúcares se convierte en alcohol y dióxido de carbono, 1% en biomasa y el 4% en otros productos (Gschaedler Mathis A. C.; *et al.*, 2004).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la fermentación de mostos por medio de la levadura *K. marxianus* sp PE1, observamos que en las 72 horas de fermentación obtenemos un fermentación modelo, ya que obtenemos porcentajes de 94% (Tabla 6). Sin embargo, la destilación de estos mostos se realiza hasta las 90 horas lo que provoca que la riqueza alcohólica sea de 6.87% v/v de etanol, lo que podría pensarse que el porcentaje de fermentación fuera del 85%.

La riqueza alcohólica obtenida fue comparada con la obtenida por la levadura *S. cerevisiae*, utilizada en la fábrica Embajador Jalisciense, de acuerdo con los datos proporcionados observamos que la riqueza alcohólica obtenida en esta fábrica es de 5% v/v de etanol, es decir un 37% menos que las obtenidas por la levadura *K. marxianus* sp PE1 (Fig. 20).

Estos resultados demuestran la capacidad de la levadura *K. marxianus* sp PE1 en transformar azúcares reductores en etanol obteniendo fermentaciones modelo y mejor riqueza alcohólica comparada con la *S. cerevisiae*.

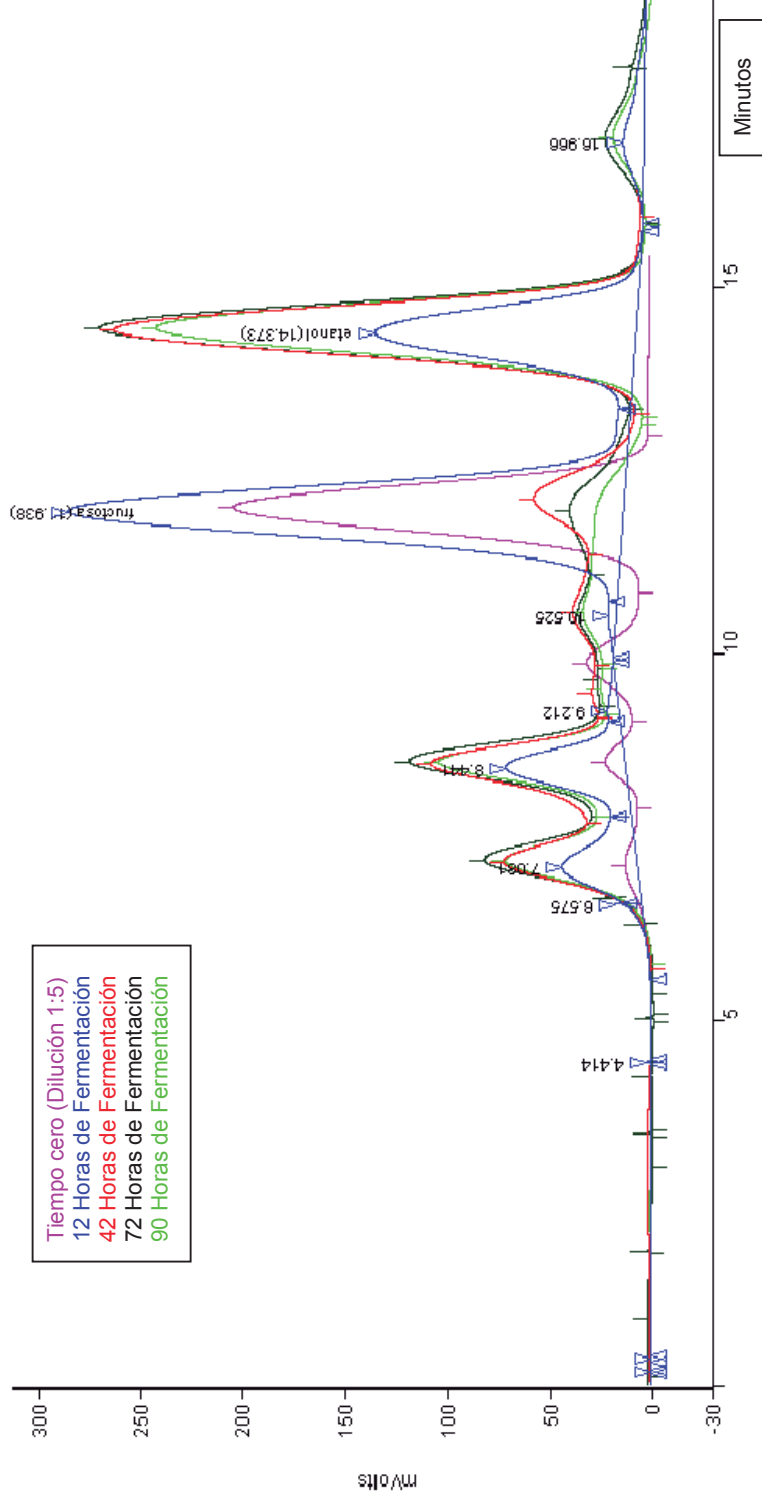


Fig. 19 Producción de etanol a diferentes tiempos de fermentación de mostos de agave monitoreado en HPLC

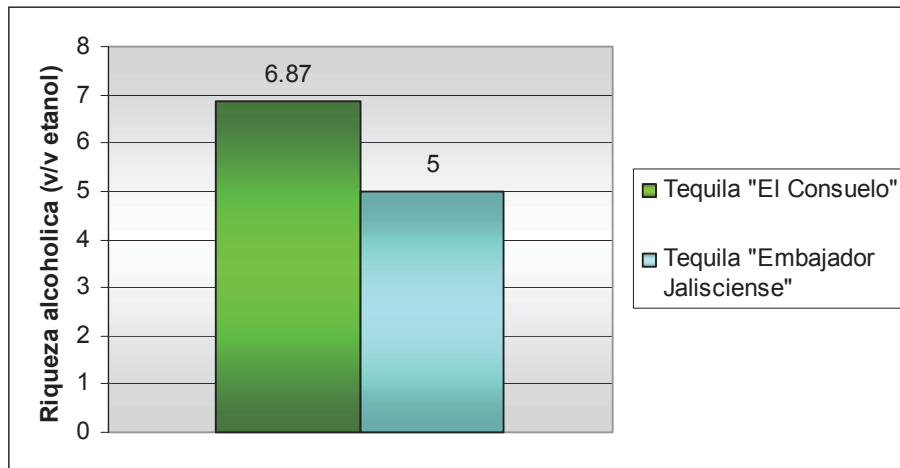


Fig. 20. Comparativo de la riqueza alcohólica producida por la levadura *K. marxianus* sp PE1 y la levadura *S. cerevisiae* utilizada en la fábrica Embajador Jalisciense.

VII.4 Rendimientos de producción obtenidos al finalizar la fermentación de mostos a través de la levadura *K. marxianus* sp PE1

La riqueza alcohólica producida durante la fermentación de mostos indican teóricamente los rendimientos de producción que se pueden obtener. En este caso obtuvimos riqueza alcohólica de 6.87% v/v de etanol por lo que nuestro rendimiento de producción sería de 5.8 Kg/l de tequila, sin embargo los resultados obtenidos al final de la destilación indican rendimientos de 6.4 Kg/l de tequila (Fig. 21). Esta variación puede ser debido a que no se tuvo un adecuado proceso de destilación y esto puede ser debido a:

- Insuficiente capacidad en el sistema de agua de enfriamiento.
- Destilación demasiado rápida.
- Temperatura del agua de enfriamiento demasiado alta (superior a los 25°C).

Aun contando con estas deficiencias observamos que los rendimientos de producción producidos por la levadura *K. marxianus* sp PE1 aumentan en un 20% comparado con los rendimientos obtenidos por la levadura *S. cerevisiae*.

La cantidad de tequila producido por la levadura *K. marxianus* sp PE1 es mayor a la producida por la *S. cerevisiae* (Fig. 22), esta variación significa una disminución en los costos de producción, lo que para los productores significa un aumento en las ganancias monetarias.

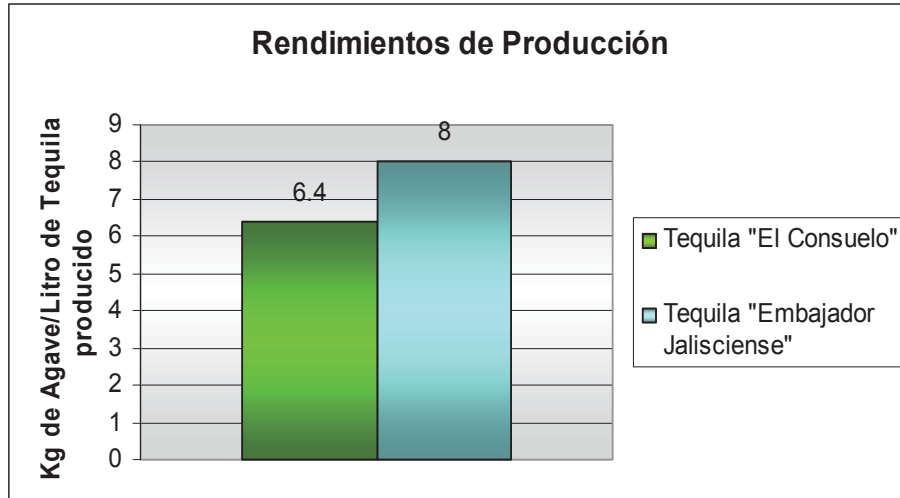


Fig. 21. Rendimientos de producción de la levadura *K. marxianus* sp PE1 y la levadura utilizada en la producción del tequila Embajador Jalisciense.

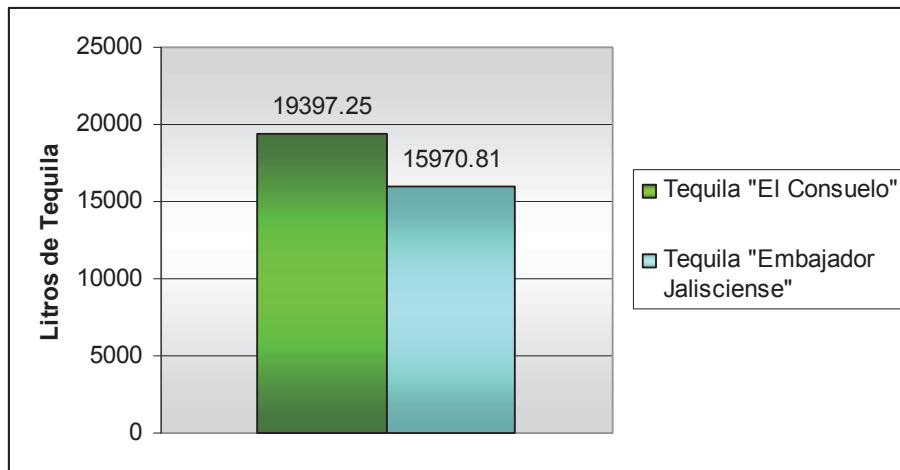


Fig. 22 Tequila producido por dos levaduras diferentes a partir de 133090 Kg. de Agave.

La producción de tequila por la levadura *K. marxianus* sp PE1 es de 19397.25litros y la producción de tequila producido por la levadura *S. cerevisiae* es de 15970.81 litros, es decir una disminución del 17.66% en tequila.

VII.5 Perfil aromático del tequila “El Consuelo”

La aceptación de las diferentes bebidas alcohólicas entre los consumidores la determinan, en gran medida, los atributos de color, textura, sabor y olor propios. El olor característico con que se diferencia a una bebida de otra se debe a una mezcla muy compleja de diversos compuestos volátiles presentes solo en pequeñas cantidades. La composición cualitativa y cuantitativa de estos compuestos volátiles determina el aroma específico de cada bebida (Richard 1992).

Los diferentes compuestos aromáticos identificados en el tequila “El Consuelo” (Fig. 23, Tabla 7) muestran diversos alcoholes, los cuales aportan una gran diversidad de notas olfativas, entre las más importantes se pueden mencionar la herbácea, frutal, floral, etc.; aldehídos, los cuales proporcionan notas aromáticas como cítrica y floral; ésteres que son los compuestos más abundantes y los cuales proporcionan notas frutales.

El perfil aromático del tequila “El Consuelo” es comparado con el tequila “Embajador Jalisciense” (Fig. 24), en ambos casos podemos observar ésteres, alcoholes, aldehídos, etc. Sin embargo la cantidad de compuestos organolépticos encontrados en el tequila producido por la levadura *K. marxianus* sp PE1 muestra concentraciones mayores lo que nos indica la capacidad de la levadura en no solo transformar azúcares reductores en etanol, sino también es capaz de producir compuestos aromáticos especiales. En el caso específico del feniletil alcohol se ha identificado en fermentaciones, realizadas por la levadura *K. marxianus*, de jugos de pera y manzana aislando este compuesto y adicionándolo a perfumes (Wittmann, 2002).

Los componentes identificados en el tequila “El Consuelo” nos hablan de la calidad del tequila en cuanto a compuestos aromáticos, lo que hace suponer que tendrá una buena aceptación en el mercado.

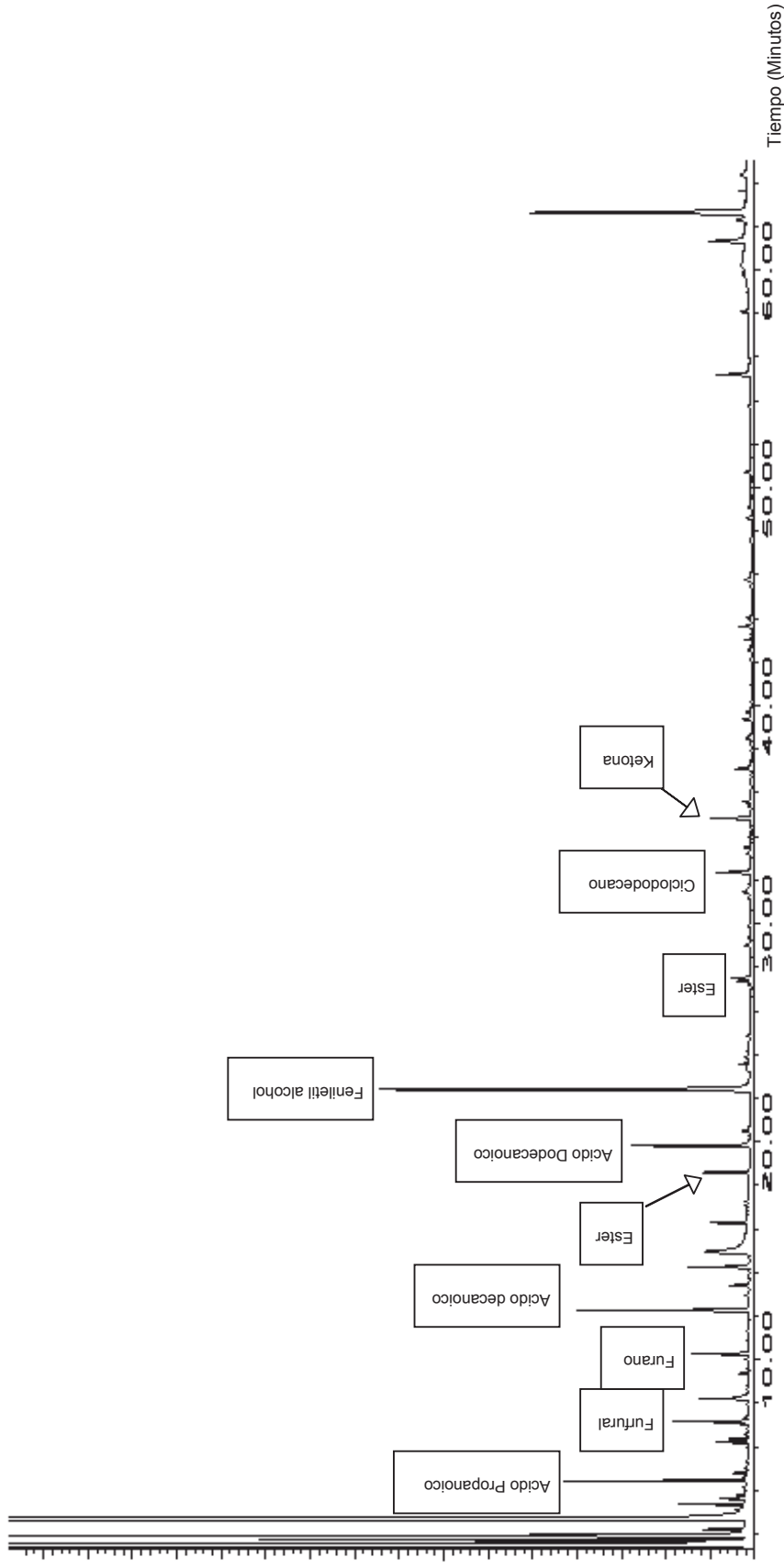


Fig. 23 Perfil aromático del tequila "El Consuelo"

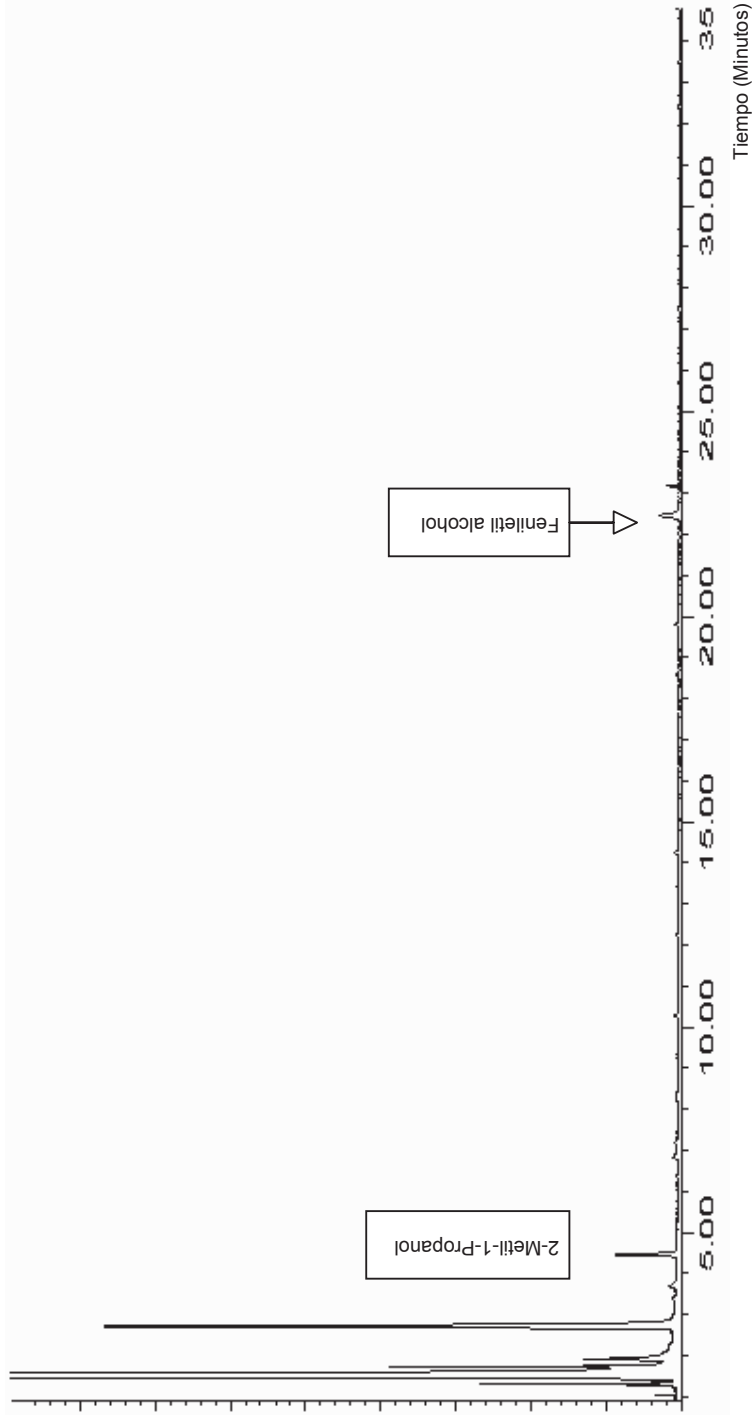


Fig. 24 Perfil aromático del tequila "Embajador Jalisciense"

Tabla 7 Compuestos identificados en el tequila producido por la levadura *Kluyveromyces marxianus* sp PE1

RT	Area Pct	Library/ID	Compuesto
1.48	26.6918	Etanol	Alcohol
1.7123	1.4505	1-Propanol	Alcohol
1.9169	6.7857	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol
2.2102	0.282	1-Butanol	Alcohol
3.7776	0.0791	4-Penten-1-ol	Alcohol
4.4315	0.9726	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	Acido
6.2096	0.195	Octanoic acid, ethyl ester	Acido
6.6129	0.0257	L-Alanine, N-(1-oxopentyl)-, methyl ester	Ester
6.8238	0.0355	Dimethylamine	Amina
7.1568	0.4778	Furfural	Furano
7.9573	0.0262	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-	Acido
8.2048	0.4813	Ethanone, 1-(2-furanyl)-	Furano
8.5256	0.0149	Methylpent-4-enylamine	Otros
8.6478	0.0261	S-[Tri-t-butoxysilyl]-2-mercaptoethylamine	
9.6102	0.0148	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-	Acido
10.0227	0.0373	Dimethylamine	Amina
12.2622	1.2331	Decanoic acid, ethyl ester	Componente mayoritario
13.4018	0.1844	2-Furanmethanol	Furano
14.6667	0.0126	L-Alanine, N-(1-oxopentyl)-, methyl ester	Ester
18.5867	0.3797	1-Phenethyl-pyrrolidin-2,4-dione	Ester
19.818	0.9418	Dodecanoic acid, ethyl ester	Componente m.
20.484	0.0736	Pentadecanoic acid, 3-methylbutyl ester	Acido
22.3936	4.0226	Phenylethyl Alcohol	Alcohol
23.2919	0.2333	Allophanic acid, phenyl ester	Ester
23.8785	0.0957	Phenol	Alcohol
24.129	0.0691	Allophanic acid, phenyl ester	Ester
24.3887	0.0963	Phenol	Alcohol
26.778	0.0193	Benzenemethanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl-	Alcohol
27.5112	0.1936	Tetradecanoic acid, ethyl ester	Ester
30.4229	0.0237	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-	Acido
31.4526	0.1072	Benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester	Ester
32.3478	0.3755	Cyclododecane	Otros
34.8348	0.3345	Ethyl tridecanoate	Ketona
36.5305	0.0273	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-	Acido
37.1018	0.178	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	Alcohol
38.5989	0.0465	Acetic acid, methoxy-, 2-phenylethyl ester	Ester
39.3841	0.0993	Cyclotetradecane	Otros
43.0474	0.0119	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-	Acido
43.6371	0.104	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	Acido
45.4611	0.0221	Acetic acid, methoxy-, 2-phenylethyl ester	Ester
50.7163	0.0744	Tetradecanoic acid	Acido
73.7471	1.1845	2,2-Dimethyl-propionic acid, 10-azido-9,10-dihydro-phenanthren-9-yl ester	Ester

IX. CONCLUSION

La utilización de biorreactores asegura la obtención de un pie de levadura puro y la obtención de cantidades elevadas de biomasa por lo tanto una disminución en la cantidad de esta para la inoculación de mostos, además se asegura que la colonización de los mostos sea de un 100% de la levadura

Los resultados obtenidos deben inducir a la industria tequilera a utilizar sus propias levaduras, perfectamente caracterizadas y propagadas de la manera mas adecuada para disminuir las perdidas ligadas al proceso de fermentación y garantizar la homogeneidad de los mostos fermentados.

X. LITERATURA CITADA

Apriyantano, A.; Ames, J. M. (1993). "Xylose-lysine model systems: the effect of pH on the volatile reaction products. J. Sci. Food Agric. 61: 477-484.

A.R. Estrada-Godina, A. E. Cruz-Guerrero, P. Lappe, M. Ulloa, M. García-Garibay and L. Gomez-Ruiz (2001). "Isolation and identification of killer yeast from Agave sap (aguamiel) and Pulque". World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 557-560.

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

Barrera, J. (2002). "Modelos de procesos biológicos mediante técnicas de inteligencia artificial. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería". *Avances y Perspectivas*, 21:341-344.

Benn, S.M.; Peppard T.L. (1996). "Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis". J. Agric. Food Chem., 44: 557-566.

Berry. D.R.; Watson, D.C (1987). "Production of organoleptic compounds", in *Yeast Biotechnology*, Berry; Russell; Stewart (eds.), Allen and Unwin, London.

Brands, C. M. J.; Alink, G. M.; van Boekel, M. A. J. S.; Jongen, W. M. F. (2000). "Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction. J. Agric. Food Chem. 48: 2271-2275.

Castro Castro J. (2003). Anteproyecto de una planta de elaboración de tequila. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Nayarit.

Cedeño. M.; Alvarez- Jacobs, J. (2000). "Tequila production from agave", in the Alcoholic Textbook, third edition, Murtagh & Associates (eds), Nottingham University Press.

Consejo Regulador del Tequila, (CRT), Mexico 2004.

Fabre E. Cathy, Blanc J. Philippe, Goma Gerard (1998). "Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*". Biotechnol. Prog. 14: 270-274.

Gschaedler Mathis Anne C; Ramírez C. J.J; Díaz M. Dulce M.; Herrera López J. E.; Arellano Plaza M.; Arrizón G. Javier; Pinal Z. Leticia. "Fermentación, Etapa clave en la elaboración del Tequila. Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y Perspectivas. CIATEJ. 91-95.

Hofmann, T.; Munch, P; Schieberle, P. "Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions". J. Agric. Food Chem. 48: 434-440.

Kurtzman, CP.; Fell, J.W. (1998). "Definition, classification and nomenclature of the yeast", en The yeast, a taxonomic study, 3rd edition, Kurtzman, C.P; Fell, J.W. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam.

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

Lamas R. Roman; Sandoval F. Georgina C; Osuna T. Adrián A.; Prado Ramírez R.; Gschaedler Mathis Anne C. (2004). "Cocimiento y Molienda". Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y Perpestivas. CIATEJ. 41-42.

Larsson S. (2000) Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.

Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A, Nilvebrant NO., Jonson LJ. (2000). "The influence of Lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*". Appl Biochem Biotechnol 84: 617-32.

López, M. G.; Mancilla-Margalli, N. A. Maillard (2000) "Compounds from the thermal processing of Agave tequilana Weber var. azul. In Frontiers of Flavor Science; Schieberle, P., Engel, K.-H., Eds.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: 523-526.

Mancilla-Margalli, N.A.; López M.G. (2002). "Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of Agave Tequilana Weber var. Azul" Journal Agric. Food Chem. 50:806-812.

M.M.W. Etschmann, D. Sell & J. Schrader (2003). "Screening of yeast for the production of the aroma compound 2-Phenylethanol in a molasses-based medium". Biotechnology Letters 25: 531-536.

Paine, A.; Davan, A. D. (2001). "Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks". Human. Exp. Toxicol. 20:563-568.

Pinal, L.M.; Rodríguez, I.; Nuñez, L.; Pinal, L.; Arellano, M.; Herrera, E. (2000). "Diagnostico técnico de la etapa fermentativa en una empresa productora de tequila", Informe técnico de la CIATEJ.

Prado Ramírez R. (2002). Destilación de Tequila y Mezcal. Factores que afectan la calidad del producto. Tesis Doctoral en Ciencias en procesos

Biотecnológicos. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería. Universidad de Guadalajara.

Prado Rodriguez Rogelio (2004). "Destilación" Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y Perpestivas. CIATEJ. 123-124.

Prado-Ramírez, R.; González-Álvarez, V.; Pelayo-Ortiz, C.; Casillas, N.; Estarrón, M.; Gómez-Hernández, H. E. (2005) "The role of distillation on the quality of tequila". Int. J. Food Sci. Technol. 40: 701-708.

Pretorius, I.S (2000). "Tailoring wine yeast the new millenium". Yeast. 16:675-729.

Romano, P.; Fiore, C.; Paraggio, M.; Caruso, M.; Capace A. (2003). "Function of yeast species and strains in wine flavour". Int. J.Food Microbiol. 86:168-180.

Taherzadeh M. J., Gustafsson L., Niklasson C., & Lidén G. (2000). "Physiological effects of 5-hydroxymethyl-furfural on *Saccharomyces cerevisiae*" Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 701-708.

Vaughan-Martini, A.; Martini, A. (1995), "Fact, myths and legends on prime industrial microorganism" Journal Industrial Microbiology. 14: 514-522.

Walker, G.M. (1998), "Yeast Physiology and Biotechnology", John Wiley & Sons, New York.

Wang, X.D.; Bohlscheid, J.C.; Edwards, C.G. (2003). "Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid". J. Appl. Microbio. 94: 349-359.

Wittmann Christop, Hans Michael and Bluemke Wilfried (2002). "Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*". Yeast. 19: 1351-13

ANEXO 1 REGISTRO DE EFICIENCIAS DE HIDRÓLISIS DE EXTRACCION

HORNO/AUTOCLAVE	No. LOTE/TINA	AGAVE CRUDO					JUGO MOLIENDA				
		MOLIENDA (Kgs AGAVE)	% A.R.T. A. CRUDO	Kgs A.R.T. A. CRUDO	VOLUMEN	°Bx	% A.R.T.	Kgs A.R.T.			
AUTOCLAVE	F2	8713	24.75	2156.4675	11534	15.46	12.92	1490.1928			
AUTOCLAVE	F3	9971.5	24.75	2467.94625	13200	15.46	12.92	1705.44			
AUTOCLAVE	F4	5675.46	24.75	1404.67635	7513	15.46	12.92	970.6796			
	TOTAL	24359.96		6029.0901	32247			4166.3124			
HORNO 2	F10	8742.36	24.75	2163.7341	11880	15.65	12.92	1534.896			
HORNO 2	F11	8742.36	24.75	2163.7341	11880	15.65	12.92	1534.896			
HORNO 2	F9	8682.75	24.75	2148.980625	11799	15.65	12.92	1524.4308			
HORNO 2	F8	9832.51	24.75	2433.546225	13361.4	15.65	12.92	1726.29288			
	TOTAL	35999.98		8909.99505	48920.4			4785.61968			
HORNO 1	F7	10629.3	24.75	2630.75175	13410.9	12.48	12.92	1732.68828			
HORNO 1	F5	10069.8	24.75	2492.2755	12705	12.48	12.92	1641.486			
HORNO 1	F12	9415.9	24.75	2330.43525	11880	12.48	12.92	1534.896			
HORNO 1	F6	5884.9	24.75	1456.51275	7425	12.48	12.92	959.31			
	TOTAL	35999.9		8909.97525	45420.9			5868.38028			
AUTOCLAVE	F3	7423.21	26.14	1940.427094	10688.49	12.01	11.62	1242.00254			
AUTOCLAVE	F4	7423.21	26.14	1940.427094	10688.49	12.01	11.62	1242.00254			
AUTOCLAVE	F10	5153.23	26.14	1347.054322	7420.47	12.01	11.62	862.258614			
	TOTAL	19999.6		5227.90851	28797.45			3346.26369			
AUTOCLAVE	F2	5593.53	26.14	1462.148742	11493	12.67	11.62	1335.4866			
AUTOCLAVE	F9	5603.27	26.14	1464.694778	11513	12.67	11.62	1337.8106			
AUTOCLAVE	F11	5533.18	26.14	1446.373252	11369	12.67	11.62	1321.0778			
	TOTAL	16729.9		4373.216772	34375			3994.375			
	TOTAL GENERAL	133089.34		33450.18568	189760.75			18814.6874			

Anexo 2. Resultados de operación de destrozado y cantidad del tequila obtenido durante el proceso

Tina No.	Volumen Mosto (lt)	°Bx	R.A	Lts a 55% alc. Vol.	Litros de ordinario	% alc. Vol ordinario	Litros de ordinario a 55%	Lts de ordinario	Litros de tequila a 80% de eficiencia de rectificad	Litros de tequila a 75% de eficiencia de rectificad
F2	3300	15.46	6.4	384	557	29.4 %	295	225	180	168.75
F2	3300	15.46	6.4	384	523	30.8	293	223	178.4	167.25
F2	3300	15.46	6.4	384	570	29.2%	303	239	191.2	179.25
F2/F3	3300	15.46	6.4	384	529	27.9%	268	186	148.8	139.5
F3	3300	15.46	6.4	384	496	31.6%	284	210	168	157.5
F3	3300	15.46	6.4	384	670	26.6%	324	273	218.4	204.75
F3	3300	15.46	6.4	384	552	32%	321	268	214.4	201
F3/F4	3300	15.46	6.4	384	480	30.4%	265	182	145.6	136.5
F4	3300	15.46	6.4	384	545	30.4%	301	236	188.8	177
F4	3300	15.46	6.4	384	446	29.2%	236	186	148.8	139.5
FX	1273	*****	29.4	680	629	58.4%	668	656	524.8	492
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 2307.2	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 2163
F10	3300	15.65	7.1	426	669	34.2%	416	406	324.8	303.75
F10	3300	15.65	7.1	426	614	35.2%	383	362	289.6	271.5
F10	3300	15.65	7.1	426	670	34.2%	416	406	324.8	304.5
FX	1300	*****	29.4	694	641	60.1%	700	700	560	525
F10	3300	15.65	7.1	426	641	38.7%	393	362	289.6	271.5
F11	3300	15.65	7.1	426	579	33.6%	354	294	235.2	220.5
F11	3300	15.65	7.1	426	632	33.0%	373	326	260.8	244.5
F11	3300	15.65	7.1	426	686	32.3%	403	381	304.8	285.75
F11	3300	15.65	7.1	426	569	33.2%	344	277	221.6	207.75
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 2811.2	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 2634.75

Tina No.	Volumen Mosto (lt)	°Bx	R.A	Lts a 55% alc. Vol.	Litros de ordinario	% alc. Vol ordinario	Litros de ordinario a 55%	Lts de ordinario	Litros de tequila a 80% de eficiencia de rectificaco	Litros de tequila a 75% de eficiencia de rectificaco
F9	3300	15.65	7.3	438	513	34.4%	320	234	187.2	175.5
F9	3300	15.65	7.3	438	418	37.4%	285	185	148	138.75
F9	3300	15.65	7.3	438	545	32.8%	325	241	192.8	180.75
FX	1270	*****	31.3	722	630	63.4%	726	726	580.8	544.5
F9	3300	15.65	7.3	438	519	35.0%	330	248	198.4	182.62
F9/F8	3300	15.65	7.3	438	545	36.6%	363	300	240	256
F8	3300	15.65	7.3	438	535	38.2%	371	314	251.2	235.5
FX	1270	*****	31.8	734	636	62.1%	718	702	561.6	526.5
F8	3300	15.65	7.3	438	552	37.4%	375	321	256.8	240.75
F8	3300	15.65	7.3	438	620	38.0%	429	419	335.2	314.25
F8	3300	15.65	7.3	438	580	37.9%	400	365	292	273.75
F8	1650	15.65	7.3	219	251	35.0%	159.5	116	92.8	87
F7	1650	12.48	7.3	219	251	35.0%	159.5	115	92.8	87
FX	1273	*****	33.2	768	658	63.5%	759	749	599.2	561.75
F7	3300	12.48	7.3	438	571	36.8%	382	333	266.4	249.75
F7	3300	12.48	7.3	438	569	36.9%	381	331	264.8	248.25
F7	3300	12.48	7.3	438	580	36.2%	381	331	264.8	248.25
F7/F6	3300	12.48	7.3	438	496	35.8%	323	238	190.4	178.5
FX	1273	*****	33.8	782	658	64.2%	768	754	605.6	567.75
F6	3300	12.48	5.6	336	435	30.6%	242	174	139.2	130.5
F6	3300	12.48	5.6	336	323	28.0%	164	80	64	60
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 5824	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 5460

Tina No.	Volumen Mosto (lt)	°Bx	R.A	Lts a 55% alc. Vol.	Litros de ordinario	% alc. Vol ordinario	Litros de ordinario a 55%	Lts de ordinario	Litros de tequila a 80% de eficiencia de rectificaco	Litros de tequila a 75% de eficiencia de rectificaco
F5	3300	12.48	5.6	336	401	29.40%	214	137	109.6	102.75
F5	3300	12.48	5.6	336	356	30.60%	198	114	91.2	85.5
F5	3300	12.48	5.6	336	397	29.40%	212	133	106.4	99.75
FX	1240	*****	33.4	753	748	65.70%	893	1059	847.2	794.25
F5/F12	3300	12.48	5.6	336	402	27.60%	201	120	96	90
F12	3300	12.48	5.6	336	324	30.00%	177	93	74.4	69.75
F12	3300	12.48	5.6	336	372	28.60%	193	110	88	82.5
FX	1240	*****	35.2	798	630	64.30%	736	678	542.4	508.5
F12	3300	12.48	5.6	336	362	29.70%	195	113	90.4	84.75
F12	1650	12.48	5.6	168	180	29.90%	98	58	46.4	43.5
F10	3300	12.01	5.5	330	318	28.50%	164	81	65.61	61.509375
F10	3300	12.01	5.5	330	335	29.30%	178	96	76.8	72
F10	1650	12.01	5.5	165	180	29.90%	98	58	46.4	43.5
F10/F4	3300	12.01	5.5	330	429	32.20%	251	190	152	142.5
F4	3300	12.01	5.5	330	521	35.70%	338	346	276.8	259.5
FX	1273	*****	32.6	754	647	68.80%	750	745	596	558.75
F4	3300	12.01	5.5	330	574	36.90%	385	449	359.2	336.75
F4	3300	12.01	5.5	330	585	37.10%	395	472	377.6	354
F4/F3	3300	12.01	5.5	330	546	35.40%	351	373	298.4	279.75
F3	3300	12.01	5.5	330	513	31.20%	291	256	204.8	192
F3	3300	12.01	5.5	330	474	34.20%	295	263	210.4	197.25
F3	3300	12.01	5.5	330	471	34.60%	297	267	213.6	200.25
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA
									4969.61	4659.00

Tina No.	Volumen Mosto (lt)	°Bx	R.A	Lts a 55% alc. Vol.	Litros de ordinario	% alc. Vol ordinario	Litros de ordinario a 55%	Lts de ordinario	Litros de tequila a 80% de eficiencia de rectificacio	Litros de tequila a 75% de eficiencia de rectificacio
FX	1273	*****	32.9	761	635	63.50%	733	703	562.4	527.25
F2	3300	12.67	6.4	384	502	32.30%	295	227	181.6	170.25
F2	3300	12.67	6.4	384	372	30.00%	203	107	85.6	80.25
F2	3300	12.67	6.4	384	368	41.30%	276	198	158.4	148.5
FX	1273	*****	32.6	755	652	63.10%	748	681	544.8	510.75
F2	3300	12.67	6.4	384	359	31.10%	203	107	83.2	78
F2/F9	3300	12.67	6.4	384	422	29.90%	230	138	110.4	103.5
F9	3300	12.67	6.4	384	429	32.20%	251	164	131.2	123
F9	3300	12.67	6.4	384	660	38.70%	464	561	448.8	420.75
F9	3300	12.67	6.4	384	649	39.00%	460	542	433.6	406.5
F9	3300	12.67	6.4	384	670	38.20%	465	562	449.6	421.5
F9/F11	3300	12.67	6.4	384	552	36.10%	362	340	272	255
F11	3300	12.67	6.4	384	546	36.30%	360	338	270.4	253.5
F11	3300	12.67	6.4	384	541	35.90%	353	324	259.2	243
F11	3300	12.67	6.4	384	553	36.50%	366	241	192.8	180.75
FX	1273	*****	33.2	768	649	64.10%	756	744	595.2	558
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 4779.2	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA 4480.5
									TOTAL DE LITROS DE TEQUILA RECTIFICADO 80% 20691 LITROS	TOTAL DE LITROS DE TEQUILA RECTIFICADO 75% 19397.25 LITROS