



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



*División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Química*



**ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO FERMENTATIVO
DE CULTIVOS PUROS Y MIXTOS DE LEVADURAS EN
LA ELABORACIÓN DE MEZCAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

ELIA PÉREZ HERNÁNDEZ

ASESOR: D. C. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

CO-ASESOR: D. C. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

MORELIA, MICHOACÁN

DICIEMBRE, 2016



CONTENIDO

CONTENIDO	II
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Fermentación alcohólica	3
2.1.1 Los microorganismos	3
2.1.2 Análisis moleculares	5
2.1.3 Análisis cinético	7
2.1.4 Optimización del proceso	8
2.1.5 Composición química del mezcal	9
2.2 El Agave	14
2.2.1 Distribución de los agaves en México	14
2.2.2 El agave y el mezcal	15
2.3 Tratamiento térmico del Agave	18
2.3.1 Los furanos	19
2.3.2 Las saponinas	20
2.3.3 Optimización de la hidrólisis térmica del agave	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Microorganismos	26
6.2 Fuente de sustrato	26
6.3 Medios de cultivo	26
6.3.1 Para la conservación de las cepas	26
6.3.2 Para la propagación de las cepas	26
6.4 Formulación de inóculo	27
6.5 Análisis de las variables de los cultivos puros	27
6.6 Análisis de las variables de los cultivos mixtos	27
6.7 Determinación de las variables de respuesta	27

6.7.1	Crecimiento celular.....	27
6.7.2	Consumo de azúcares	27
6.7.3	Peso seco	28
6.7.4	pH.....	28
6.7.5	Etanol en mosto	28
6.8	Destilación de los productos de fermentación.....	28
6.9	Determinación de contenido alcohólico (% Alc. Vol.).....	29
	Método volumétrico (Alcoholímetro) (NMX-V-013-NORMEX-2005).....	29
6.10	Determinación de extracto seco	29
	Método gravimétrico (NMX-V-017-NORMEX-2005).....	29
6.11	Determinación de acidez total	29
	Método por titulometría (NMX-V-015-NORMEX-2006).....	29
6.12	Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores	29
	Por cromatografía de gases (NMX-V-005-NORMEX-2005).....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	31
7.1	Cepas de estudio	31
7.2	Hidrólisis térmica del agave	32
7.3	Análisis de cultivos puros	33
7.3.1	Análisis de variables de respuesta.	34
7.4	Seguimiento cinético.....	35
7.4.1	Crecimiento celular y consumo de azúcares	35
7.4.2	Variación de pH.....	38
7.4.3	Etanol.....	39
7.5	Determinación de parámetros cinéticos	40
7.5.1	Ajuste de los datos mediante modelo logístico	40
7.5.2	Determinación de otros parámetros cinéticos	42
7.6	Análisis estadístico de Diseño Factorial fraccionado 2^{4-1}	43
7.6.1	Maximización de la concentración de etanol.....	52
7.7	Análisis de los cultivos mixtos	53
7.8	Análisis estadístico de Diseño Simplex-Centroide	55
7.8.1	Estudio de los modelos	55
7.8.2	Análisis de varianza para el modelo cuadrático.....	55
7.8.3	Análisis de la metodología de la Superficie de Respuesta	56
7.9	Análisis químico	58
7.9.1	Cuantificación metanol y alcoholes superiores. (NMX-V-005-NORMEX-2005)	59
8.	CONCLUSIÓN	65
9.	REFERENCIAS.....	66
10.	ANEXOS.....	73
10.1	ANEXO I. NORMAS	73
10.2	ANEXO II. ARTÍCULOS	74

10.2.1	Fermentative characterization of producers ethanol yeast from <i>Agave cupreata</i> juice in mezcals elaboration. <i>Revista Mexicana de Ingeniería Química</i>	74
10.2.2	Revisión del agave y el mezcal. <i>Revista Colombiana de Biotecnología</i>	74
10.2.3	Scaling-up of mezcals fermentation using pure and mixed yeast cultures isolated from alcoholic spontaneous fermentation. <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i>	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *S. cerevisiae*. 35

Figura 2. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *C. lusitanae*. 36

Figura 3. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *K. marxianus*. 36

Figura 4. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *Z. bailii*. 37

Figura 5. Acidificación del medio cultivo respecto al tiempo de fermentación. 39

Figura 6. Curva de calibración etanol-agua 39

Figura 7. Gráficos obtenidos del ajuste de datos mediante el método logístico para: (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitanae*, (c) *K. marxianus* y (d) *Z. bailii*. 41

Figura 8. Diagramas de Pareto estandarizados para etanol (% v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitanae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular. .. 46

Figura 9. Diagramas de Pareto estandarizados para etanol (% v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitanae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular. .. 49

Figura 10. Gráficas de efectos principales para etanol (% v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitanae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular. .. 50

Figura 11. Superficies de respuesta para producción de etanol. (a) *S. cerevisiae* (b) *C. lusitanae* (c) *K. marxianus* and (d) *Z. bailii*. CC= concentración celular. pH y CC en sus puntos centrales. 52

Figura 12. Diagrama de Superficie de Respuesta estimada (a) y de contornos de superficie de respuesta (b) para % Alc. Vol. del consorcio de las tres cepas de estudio. 57

Figura 13. Gráfico de traza para % Alc. Vol. del consorcio de las tres cepas de estudio. 58

Figura 14. Cromatograma ensayo 2 (mezcla: *S. cerevisiae*+*K. marxianus*). (a) Sin estándar interno, (b) Con estándar interno. 60

Figura 15. Cromatogramas de muestras destiladas más estándar interno en los 9 ensayos del diseño experimental. 61

Figura 16. Gráfica de columnas apiladas de compuestos volátiles para cada ensayo. 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Especies de levaduras encontradas y estudiadas en el proceso de fermentación.	3
Tabla 2.	Especificaciones de las normas reguladoras del tequila y mezcal.	10
Tabla 3.	Comparación de compuestos mayoritarios contenidos en el Tequila blanco de 55 °Alc. vol., elaborado a nivel industrial, con dos levaduras distintas: <i>K. marxianus</i> UMPE-1 y <i>S. cerevisiae</i> pan 1.	11
Tabla 4.	Porcentajes de área por familias químicas obtenidas por Cromatografía de gases.	13
Tabla 5.	Concentración de compuestos mayoritarios encontrados en bebidas alcohólicas producidas de diferentes especies de agave. ND = no detectado.	13
Tabla 6.	Concentraciones recomendadas para la preparación de las soluciones concentradas (NMX-V-005- NORMEX-2005).	29
Tabla 7.	Concentraciones recomendadas para preparar las diluciones de calibración. Concentración (mg/100ml).	30
Tabla 8.	Cultivos de las cepas en medio sólido YPD.	31
Tabla 9.	Características morfológicas de las levaduras seleccionadas.	31
Tabla 10.	Características de la materia prima.	32
Tabla 11.	Hidrolisis térmica del Agave.	32
Tabla 12.	Resumen y base del diseño Factorial fraccionado 2^{4+1}	33
Tabla 13.	Matriz de ensayos, Diseño Experimental Factorial fraccionado 2^{4+1}	33
Tabla 14.	Variables de respuesta de los Diseños Factoriales fraccionados 2^{4+1} de cultivos puros. Las condiciones de cada ensayo se presentan en Tabla 12.	34
Tabla 15.	Concentraciones de etanol producido en los Diseños Factoriales fraccionados 2^{4+1} de cultivos puros. Las condiciones de cada ensayo se presentan en Tabla 12.	40
Tabla 16.	Valores de puntos centrales de factores experimentales.	40
Tabla 17.	Parámetros cinéticos obtenidos del modelo logístico. μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento; λ = tiempo de fase lag, n=3.	41
Tabla 18.	Parámetros cinéticos para determinar el comportamiento cinético en el tiempo de fermentación. Td: Tiempo de duplicación; δ : Velocidad de división; μ : Velocidad específica de crecimiento.	42
Tabla 19.	Análisis de Varianza para etanol con <i>S. cerevisiae</i> . T: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).	43
Tabla 20.	Análisis de Varianza para etanol con <i>C. lusitanae</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).	43
Tabla 21.	Análisis de Varianza para etanol con <i>K. marxianus</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).	44
Tabla 22.	Análisis de Varianza para etanol con <i>Z. bailii</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).	44
Tabla 23.	Análisis de Varianza para etanol con <i>S. cerevisiae</i> . A: Temperatura (T), C: pH, D: Concentración celular (CC).	46
Tabla 24.	Análisis de Varianza para etanol con <i>C. lusitaniae</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH.	47
Tabla 25.	Análisis de Varianza para etanol con <i>K. marxianus</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), D: Concentración celular (CC).	47
Tabla 26.	Análisis de Varianza para etanol con <i>Z. bailii</i> . A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH.	47
Tabla 27.	Niveles ideales para una máxima concentración de etanol.	52
Tabla 28.	Resumen y base del diseño Simplex-Centroide.	53
Tabla 29.	Diseño experimental Simplex-Centroide y variables de respuesta.	54
Tabla 30.	Efectos estimados del modelo completo para % Alc. Vol.	55
Tabla 31.	Resultados del Modelo Completo.	55
Tabla 32.	ANOVA para % Alc. Vol.	56
Tabla 33.	Análisis químico de los destilados, NOM-006-SCFI-2005. *mg/100 mL AA: miligramos en 100 ml de alcohol anhidro.	58
Tabla 34.	Tiempos de retención de los estándares puros.	60

Tabla 35.	Curvas de calibración por estandarización interna para cada componente y su coeficiente de determinación.....	62
Tabla 36.	Concentraciones de compuestos volátiles de los ensayos del diseño de mezclas (mg/100 ml of alcohol anhidro).	63
Tabla 37.	Porcentaje de área cromatográfica por compuesto. tr: tiempo de retención.	64

RESUMEN

En el presente estudio se analizó el comportamiento cinético de cultivos puros y mixtos de levaduras asiladas de fermentaciones espontáneas de una región productora de mezcal en Michoacán, utilizando como fuente de sustrato jugo de *Agave cupreata* previamente hidrolizado y filtrado. Para lo cual el proyecto se estructuró en tres etapas experimentales, 1) La caracterización cinética de cultivos puros de tres levaduras no convencionales: *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Clavispora lusitania* y otra del género *Saccharomyces cerevisiae*. Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{4-1} (nivel matraz), evaluando como variables independientes la temperatura (25-35 °C), los azúcares iniciales (10-14 °Brix), el pH (4.5-5.5) y la concentración celular inicial (1-3-millones de células/ml). En esta etapa también se llevó a cabo la determinación de las variables de salida (% de etanol, crecimiento celular, consumo de sustrato y pH), además de la determinación de los parámetros cinéticos para cada cepa estudiada. 2) La segunda etapa consistió en el análisis de cultivos mixtos entre las 3 cepas más productivas de etanol (*K. marxianus*, *Z. bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*). Para ello se formuló un diseño experimental Simplex-Reticular en un biorreactor de tanque agitado Applikon®, manteniendo constante la agitación (150 rpm) y aireación (1 vvm). Las condiciones para llevar a cabo los diferentes ensayos fueron: 32 °C, 14 °Brix y pH de 5.5. 3) En la última etapa experimental se realizó el análisis químico, en el cual, se destilaron y rectificaron los mostos fermentados en el biorreactor a condiciones constantes (85°C, 90 rpm). Se determinó el grado alcohólico a los destilados obtenidos para posteriormente realizar la determinación de acidez total y extracto seco. Finalmente se realizó la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles (etanol, metanol, alcoholes superiores, aldehídos, ésteres, y cetonas) por estandarización interna mediante cromatografía de gases. Todo esto procedió utilizando la metodología planteada por las normas reguladoras de bebidas alcohólicas-Mezcal-Tequila.

Palabras clave: Levadura, fermentación, diseño experimental, parámetro cinético, compuestos volátiles.

ABSTRACT

In this study, the kinetic behavior of pure and mixed cultures of yeast isolated from spontaneous fermentations in a mezcal producing region in Michoacan were analyzed, using as a source of substrate *Agave cupreata* juice previously hydrolyzed and filtered. The project was divided in three experimental stages: 1) The kinetic characterization of three nonconventional yeast in pure cultures: *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Clavispora lusitania* and another of the genus *Saccharomyces cerevisiae*. Was applied a Fractional factorial design 2^{4-1} (flask level), evaluating as independent variables the temperature (25-35 °C), the initial sugars (10-14 °Brix), the pH (4.5-5.5) and the cell concentration ($1-3 \times 10^6$ cells/ml). In this stage also was carried out the determination the output variables (% ethanol, cell growth, substrate consumption and pH), in addition to the determination of the kinetic parameters for each strain studied. 2) In the second stage, the analysis of mixed cultures between the three most ethanol productive strains (*K. marxianus*, *S. cerevisiae* and *Z. bailii*) was performed. For this purpose a Simplex-Reticular experimental design was applied in a stirred tank bioreactor maintaining constant the agitation (150 rpm) and the aeration (1 vvm). The conditions to carry out the different tests were: 32 °C, 14 °Brix and 5.5 of pH. 3) In the final experimental stage, the chemical analysis was performed, in which was distilled and rectified the musts fermented in the bioreactor at constant conditions (85°C, 90 rpm). The alcoholic grade of the distillates obtained was determined and subsequently the total acidity and dry extract degree were obtained. Finally the identification and quantification of volatile compounds (ethanol, methanol, higher alcohols, aldehydes, esters, and ketones) by internal standardization by gas chromatography was conducted. All this proceeded using the methodology proposed by the regulatory standards of the Mezcal-Tequila alcoholic-drinks.

Keywords: Yeast, fermentation, experimental design, kinetic parameters, volatile compounds.

1. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México obtenida por procesos artesanales en su mayoría, aunque también se obtiene por procesos industriales en diversos estados con denominación de origen. El proceso incluye las siguientes etapas de producción: a) la selección y corte de la materia prima, b) la cocción del agave, c) la molienda del mosto, d) la fermentación del jugo fructosado, e) la destilación y la rectificación, f) y finalmente la maduración del destilado. Eventos durante cualquiera de estas etapas tienen el potencial de afectar la calidad sensorial y química del producto final y sus rendimientos. Estas características son factores clave para una buena aceptación por el consumidor en función de las características organolépticas que percibe, como el sabor, el aroma y el cuerpo.

Las bebidas alcohólicas como el mezcal presentan una amplia variabilidad en su composición química y propiedades sensoriales, esto como resultado del inmenso número de microorganismos que pueden participar en el proceso de fermentación (natural o espontánea) con o sin la adición de otros azúcares permitidos por la norma reguladora; así como por la gran diversidad de especies de agave utilizados; por los diferentes métodos para llevar a cabo la hidrólisis térmica del agave; por las diferentes prácticas locales del proceso de destilación y rectificación; por el proceso reposo o añejamiento y por la denominación de origen que se encuentra muy dispersa en el territorio mexicano, contrario al tequila que es la bebida con menor variabilidad por ser producida de una única especie de agave y contar con un proceso industrializado. Todo esto aunado a la falta de estandarización de los procesos, por ser en su mayoría conducidos por sistemas tradicionales, involucra que no existan estudios concretos sobre un proceso o producto específico que permita la mejora de las etapas de producción. Existe además escasa información sobre el análisis de bebidas artesanales como el mezcal, la poca información disponible es un importante antecedente de los logros y avances que se han realizado y que comenzarán a surgir en esta área de investigación como resultado de la actual y creciente demanda de este tipo de bebidas y de su regulación para llevar al mercado nacional e internacional un producto de calidad. Lo importante no sólo es conocer los compuestos mayoritarios como lo plantea Botello et al., (2007) cuya presencia está reglamentada, sino también aquellos componentes minoritarios que confieren una huella

distintiva de cada producto, propia de un agave, de una región, de un procesamiento; que permita elucidar pruebas de autenticidad y diferenciación de las distintas zonas mezcaleras. Esta variabilidad no debe considerarse como sinónimo de falta de calidad, sino como la expresión de particularidades propias y distintivas de cada región productora de mezcal. Motivo por el cual es de vital importancia estudiar los compuestos que constituyen el mapa químico de cada mezcal, los microorganismos de los que derivan estos compuestos, el tipo de agave utilizado y el proceso local empleado en su elaboración para así tener el conocimiento necesario que permita caracterizar apropiadamente los diferentes mezcales producidos en México. También es importante que se realicen prácticas de manejo sustentables en la cosecha del agave, permitiendo que las especies continúen regenerándose, ya que actualmente existe una preocupación por preservar las diferentes especies de agave silvestre y cultivado que está siendo explotado sin medidas de control alguno y se pone en riesgo su conservación. Esto a consecuencia del creciente comercio del mezcal para el mercado nacional y para exportación, lo que da lugar a la intensificación en la extracción de agave. Es importante por ello, que la producción de mezcal se realice mediante procesos sustentables, lo cual exige grandes cambios en la cadena productiva y la adopción de nuevas innovaciones científicas y tecnológicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fermentación alcohólica

Como en todos los procesos de producción de bebidas alcohólicas, existen variables del proceso que influyen en la productividad y calidad de las bebidas. En el caso de la fermentación, la levadura utilizada en el proceso y el método utilizado, así como el contenido de azúcares y otros componentes adicionados al mosto son variables que influyen en la productividad y características organolépticas finales de la bebida, ya que se produce etanol y otros compuestos aromáticos, que definen directamente las principales características del mezcal (López et al., 2012; De León et al., 2008²).

2.1.1 Los microorganismos

En la producción de mezcal, la fermentación espontánea es una práctica común, estas fermentaciones son aquéllas que se producen de forma natural, las realizan las levaduras provenientes de la planta (*Agave*) y del material de la bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Existen numerosos estudios basados en la identificación de las dinámicas poblacionales responsables de estas fermentaciones (Tabla 1), las cuales se ha traducido en un menor rendimiento y calidad sensorial, debido a las variaciones en el proceso de producción entre cada lote, ocasionado por la presencia de varias especies de microorganismos en el mosto como las levaduras y los hongos, así como de bacterias de diversos géneros, las cuales compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos que generan una disminución en la producción de etanol ocasionando un destilado de baja calidad (Lanchance, 1995; Lappe et al., (2008). Es importante el estudio minucioso de las poblacionales que conforman dichas fermentaciones, ya que es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una región, con lo cual se lograría utilizar las cepas nativas como iniciadoras de la fermentación en otros procesos y regiones, por encontrarse mejor adaptadas; presentar buenos rendimientos y mediante las cuales es posible conservar las características propias de una región determinada (Kunkee y Amerine, 1970; Ribéreau et al., 1975; Lafon, 1983; Zambonelli, 1988).

Tabla 1. Especies de levaduras encontradas y estudiadas en el proceso de fermentación.

Contribución	Autores
En primeros días de fermentación, proliferan: <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> , <i>Candida</i> y en menor medida <i>Hansenula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Metschnikowia</i> .	Querol et al., (1990); Longo et al., (1991); Fleet y Heard, (1993); Schütz y Gafner, (1994)
Variaciones en los procesos por la presencia de: <i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Torulaspota</i> , <i>Kluyveromyces</i> y <i>Hanseniaspora</i> , así como de bacterias de diversos géneros.	Lanchance (1995) y Lappe et al., (2008)
<i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora spp.</i> , <i>K. marxianus</i> proporcionan un progresivo paso a las cepas del género <i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Candida milleri</i> y <i>Brettanomyces spp.</i>	Lanchance (1995)
<i>S. cerevisiae</i> muestra elevadas producciones de biomasa y etanol, mientras <i>Kloeckera africana</i> y <i>Kloeckera apiculata</i> , mayor tolerancia al etanol.	Díaz et al., (2008)

Así, en los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios que proliferan son levaduras no convencionales. Después de los primeros días, estos géneros son drásticamente reducidos debido a una supuesta intolerancia al etanol (Kunkee, 1984) y/o a una limitación nutricional (Valle, 2009), dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como son las *Saccharomyces*. De hecho, es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau, 1985).

Algunos estudios realizados por Fleet et al., (1984); Heard y Fleet (1986), han demostrado que algunas especies de no-*Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, ya que estas especies sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar crecimientos significativos que influyen en la composición organoléptica de las bebidas alcohólicas. Son particularmente importantes, ya que sintetizan una gran variedad de compuestos volátiles que contribuyen de manera determinante al bouquet de la bebida (Díaz et al., 2008). Estos tipos de levaduras tienen rendimientos de entre 25 a 49 g/L de etanol pero pueden llegar a producir cantidades de etanol incluso iguales a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando se les cultive en un medio apropiado que cumpla con las características nutricionales y físicas para su óptimo desarrollo (Díaz et al., 2011), por medio de la adición de nutrientes, los cuáles mejoran la eficacia de la fermentación, aumentando el consumo de azúcares reductores y la producción de etanol, en comparación con fermentaciones con ausencia de estos (Díaz et al., 2012). Además, las modificaciones que produzcan éstas en la composición del mosto tendrán un efecto en la cinética de la fermentación y comportamiento

bioquímico de *Saccharomyces*. La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presentes en el mosto depende de varios factores como son la localización geográfica, las condiciones climáticas, así como la variedad y madurez del *Agave*.

Díaz et al., (2008), estudió cinco cepas de levaduras aisladas de jugo de agave para evaluar sus capacidades fermentativas y aromáticas. Sus experimentos fueron realizados utilizando jugo de agave suplementado con fosfato de amonio, proceso que es muy común en las destilerías de tequila. Clasificaron tres cepas como *S. cerevisiae*, las cuales mostraron elevadas producciones de biomasa y etanol. También clasificaron a *Kloeckera africana* y *Kloeckera apiculata* como cepas con la mayor tolerancia al etanol, las cuales mostraron un escaso crecimiento. Los resultados encontrados sugirieron que estas cepas se vieron afectadas por una limitación nutricional y/o a compuestos tóxicos presentes en el jugo de agave. Las cepas de *S. cerevisiae* produjeron predominantemente alcohol amílico, isoamílico, n-propanol, 2-feniletanol, ácido succínico, glicerol, metanol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetaldehído e isobutanol. Mientras que las cepas del género *Kloeckera* mostraron una alta producción de ácido acético, 2-finil acetato de etilo y acetato de etilo. La concentración de metanol fue significativamente diferente entre las levaduras estudiadas. La diversidad entre las 3 cepas de *S. cerevisiae* fue mayor en el perfil aromático que en el nivel genético y el cinético. Por otra parte la diversidad en las cepas del género *Kloeckera* fue menor en cuanto a *S. cerevisiae*, a pesar de pertenecer a dos especies diferentes.

2.1.2 Análisis moleculares

Otros estudios fueron los realizados por Gschaedler et al. (2011), quienes caracterizaron el proceso de fermentación del mezcal de San Luis Potosí, México, e identificaron las levaduras presentes en la fermentación utilizando métodos moleculares de cultivos dependientes (RFLP de 5.8S-ITS y secuenciación de los dominios D1/D2), también utilizaron métodos de cultivos independientes (DGGE). Analizaron 2 mostos diferentes obtenidos de *Agave salmiana* e identificaron 192 colonias de levaduras diferentes, las cuales fueron sembradas en placas de agar WL e identificadas por RFLP de ITS-58S-ITS2 del gen de rRNA, con endonucleasas de restricción (*HhaI*, *HaeIII* y *HinfI*). Las cepas identificadas fueron *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora*

lusitaniae, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*, las cuales fueron confirmadas por secuenciación de las regiones D1-D2 de el gen rRNA 26S. Con el método PCR-DGGE las bandas correspondientes a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* fueron claramente identificadas, confirmando los resultados obtenidos con técnicas clásicas.

Steve et al., (1999), utilizó los patrones de restricción generados a partir de la región que abarca los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) y el gen rRNA 5.8S para identificar un total de 132 especies de levaduras pertenecientes a 25 géneros diferentes. En muchos casos, el tamaño de los productos de PCR y los patrones de restricción obtenidos con endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* arrojaron un perfil único para cada especie, demostrando que el uso de la técnica “Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción” (RFLP) proponía un nuevo método de rutina rápido y fácil de identificación de levaduras. Técnica que más tarde fue utilizada por González et al., (2012), quien realizó la caracterización molecular y fermentativa de una cepa de levadura aislada de una región productora de mezcal, mediante la técnica RFLP. La levadura LEVM que había proporcionado un amplificado de 880 pb fue digerida con la enzimas *CfoI*, la cual proporciono tres patrones de restricción uno de ellos de un tamaño de 320 pb y otro de 365 pb y uno de 150 pb, con la enzima *Hae III* generó patrones de 150 pb, 180 pb, 230pb y 320 pb, la enzima *HinfI* genero un perfil de 365 pb y uno de 155 pb. Comparando dichos perfiles de restricción con los creados en la levadura *S. cerevisiae* 288 C se puede observar que son similares por lo que la levadura LEVM pertenece al género de *S. cerevisiae*.

De la Torre, (2010), también realizó trabajos moleculares sobre microorganismos presentes en fermentaciones para la elaboración de mezcal, él estudió la dinámica poblacional de las principales especies de levaduras presentes durante la fermentación en medio sintético y medio de mosto, donde analizó la cinética de metabolitos y la sucesión poblacional de cultivos mixtos de aislamientos nativos de *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, y *Torulaspora delbrueckii*. Determinó que el análisis de las fermentaciones con la técnica ARISA (análisis automatizado de los espaciadores intergénicos) permitía obtener patrones diferenciales en los electroferogramas de las 3 especies, representados por picos de diferente tamaño y

fluorescencia, demostrando con ello que la técnica puede ser utilizada tanto como un sistema de identificación y etiquetamiento molecular de las especies, así como para verificar que la población deseada se encuentre presente en la fermentación. El análisis de las poblaciones por la técnica FISH (hibridación con fluorescencia *in situ*) le permitió cuantificar la concentración celular de cada una de las especies durante toda la fermentación, y con la cual observó que en las primeras horas de cultivo el crecimiento era similar en las 3 cepas pero también que después de 24 horas *S. cerevisiae* comenzaba a predominar, mientras que las otras especies permanecían viables aunque en baja concentración hasta el final de la fermentación, resultados similares a los planteados por Querol, (1990), tal como se mencionó en párrafos anteriores.

2.1.3 Análisis cinético

La levadura utilizada en la fermentación está estrechamente relacionada con el contenido de compuestos volátiles en los destilados, tal relación implica el estudio del comportamiento cinético de las cepas seleccionadas ya sea puras o en consorcio. En cuanto a parámetros cinéticos existe una gran cantidad de estudios relacionados, como el caso de Ramírez y Molina, (2005), quien estudió el comportamiento cinético de *S. cerevisiae*, ellos encontraron que al aumentar la concentración de levaduras de 50 a 70 millones por mililitro a 28 °C, reducían la fase “lag” en una hora, y que la velocidad específica máxima de crecimiento era de 0.38 h⁻¹, con una constante de saturación de 1.35 g/L, determinaron además un rendimiento de 1.68 para esta cepa. González et al., (2012), reportó un crecimiento celular de *Kluyveromyces marxianus* de 3.58x10⁸ cel/mL con una concentración de etanol producido de 12.45 % v/v, al igual que Carbó et al., (2008), quien reportó una producción de etanol de 12 a 13 % entre las 24 y 48 horas de fermentación utilizando cultivos mixtos de *Brettanomyces/Dekkera* y *S. cerevisiae*. González et al., (2012), también encontraron que para obtener mayores cantidades de etanol el proceso debe aproximarse hacia sustratos intermedios (12 °Brix) utilizando jugo de *Agave cupreata*, y una temperatura de 28°C aproximadamente. El consumo de sustrato para *K. marxianus* varía de una concentración inicial de 109.5 g/L de azúcares (10°Brix) llegando a una cantidad final de 9.01 g/L, Díaz et al., (2011), obtuvieron valores similares con *Kloeckera africana* y *Agave tequilana* reportando un consumo de sustrato de aproximadamente 105.32 gr/L. Santiago et al., (2009),

obtuvo concentraciones de 4.2×10^7 a 9.8×10^7 cél/mL a las 54 horas de fermentación utilizando *Agave potatorum* y 1.6×10^7 a 2.5×10^7 cél/mL con *Agave angustifolia*. Sin embargo son concentraciones bajas comparadas con las reportadas en el caso del tequila en condiciones rústicas, donde la población alcanza valores de 6 a 15×10^7 cél/mL (Cedeño, 1995) o en condiciones controladas de 2×10^7 células/mL (Arrizon y Gschedler, 2006; Arrizon y Gschedler, 2002).

2.1.4 Optimización del proceso

Otra área de estudio involucrada en las fermentaciones alcohólicas es la optimización del proceso. De León et al., en (2008)², aplicó la metodología de Superficie de Respuesta para optimizar la etapa de fermentación en la producción de mezcal a partir de *Agave salmiana*. Utilizaron un diseño factorial 3k, para obtener modelos que describieran la relación entre la producción de etanol, el proceso de productividad y el rendimiento de producto respecto a la temperatura de fermentación y a la concentración de azúcares, encontrando que las condiciones fermentativas si afectaban la composición de alcoholes superiores en el mezcal y establecieron como condiciones operativas óptimas, 28 °C de temperatura y 105 g/L de azúcares iniciales. Al igual que Pérez et al., (2013), quienes estudiaron el comportamiento cinético de biomasa y etanol nivel matraz durante la fermentación alcohólica, donde utilizó jugo de *Agave cupreata* y se establecieron como variables de estudio: tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, utilizando un diseño Box-Behnken de segundo orden, ellos establecieron como condiciones ideales 28 °C de temperatura, 12 °Brix de azúcares iniciales y la levadura perteneciente al género *K. marxianus*, la cual presentó los mejores rendimientos de etanol.

Otra área relacionada con los procesos fermentativos y de relevante importancia es la planteada por Escalante et al., (2009), quienes describieron un algoritmo para el monitoreo continuo de las concentraciones de biomasa y etanol, así como de la velocidad del crecimiento celular durante la fermentación alcohólica para la elaboración de mezcal. El algoritmo desarrolla la función con las mediciones lineales del potencial redox. El procedimiento combina una red neuronal artificial que relaciona el potencial redox de las concentraciones de biomasa y etanol con el algoritmo, el cual utiliza las estimaciones de

biomasa para inferir la tasa de crecimiento en la fermentación. Los resultados muestran que el potencial redox es un valioso indicador de la actividad metabólica de los microorganismos en la fermentación del mezcal. Además, la tasa de crecimiento estimada puede ser considerada como una evidencia directa de la presencia de cultivos mixtos de microorganismos, sin embargo, los datos totales de biomasa no proporcionan una evidencia definitiva de ello. Ellos además presentaron el diseño detallado del software del sensor utilizado, así como su aplicación experimental nivel laboratorio.

2.1.5 Composición química del mezcal

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila y mezcal), son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no volátiles producidos en varias etapas del proceso de producción, cuya mezcla compleja define sus atributos organolépticos, sensoriales y la aceptación por el consumidor (López, 1999; Vallejo y González, 2000; Vallejo et al., 2004; Cole y Noble, 2003). Aunque se sugiere que en su mayoría son producidos principalmente por la o las levaduras contenidas naturalmente o adicionadas en la fermentación del mosto de agave (Díaz et al., 2008) pueden también estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas del cultivo; por otra parte pueden generarse por las características del mosto y las condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Cole y Noble, 2003). Por tal motivo la composición de la comunidad microbiana es un factor clave en la calidad aromática de las bebidas fermentadas (López et al., 2012; Been y Peppard, 1996) y una vez destilado el mosto, se requiere del análisis químico de sus componentes volátiles, este representa un problema analítico complejo, desde su aislamiento, caracterización e interpretación (Botello et al., 2007).

El mezcal es una bebida que al igual que todas las bebidas fermentadas o destiladas tienen determinado grado alcohólico y una gran variedad de compuestos aromáticos que le confieren las características sensoriales que lo diferencian de las demás. Esta bebida se encuentra regulada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-94), la cual se apega sus formas tradicionales de producción, incidiendo en el control de la calidad, higiene y legitimidad del producto; también señala los requisitos para su producción, estableciendo las características y especificaciones que deben cumplir los usuarios autorizados para producir

y/o comercializar la bebida. La norma reguladora del mezcal no se encuentra actualizada y las especificaciones que establece no son tan estrictas como las que especifica la norma reguladora del Tequila (NOM-006-SCFI-2005), esto quizá por el motivo de que la mayoría de los productores de mezcal cuentan con sistemas artesanales para conducir sus procesos y difícilmente pueden lograr cumplir con la normatividad vigente mientras no estandaricen sus procesos. Se muestran a continuación (Tabla 2) las diferencias entre ambas normas.

Tabla 2. Especificaciones de las normas reguladoras del tequila y mezcal.

Determinación	Mezcal	Tequila
% de Alcohol	NMX-V-013	NMX-V-013-NORMEX-2005
Alcoholes superiores	NMX-014-S	NMX-V-005-NORMEX-2005
Extracto seco y cenizas	NMX-V-017	NNM-V-017-NORMEX-2005
Metanol	NMX-V-021	NMX-V-005-NORMEX-2005
Etiqueta	NOM-030-SCFI	NMX-V-049-NORMEX-2004
Furfural	----	NMX-V-004-NORMEX-2005
Aldehídos y ésteres	----	NMX-V-005-NORMEX-2005
Azúcares reductores	----	NMX-V-006-NORMEX-2005
Muestreo	NMX-Z-012	----
Minerales	----	NOM-117-SSA1-1994
Prácticas de higiene y sanidad	----	NOM-120-SSA-1994
Salud ambiental, Agua para uso	----	NOM-127-SSA1-1994

El contenido de metales ha sido reportado como un parámetro de calidad en relación a la autenticidad de bebidas destiladas y no destiladas. Sin embargo, la mayoría de los productores utilizan alambiques de cobre como equipo de destilación, otros más utilizan aleaciones de cobre y acero o sólo de madera. Lo anterior indica un alto grado en cuanto al uso del cobre, y la NOM-SSA1-142-1995 (que señala máximo 2 mg de cobre/L) no es adecuada, ya que la mayoría de los productos obtenidos, con el método tradicional presentan concentraciones de cobre superiores a las permitidas por dicha normativa.

Se han identificado componentes en el mezcal que por su naturaleza química se clasifican en acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos, siendo

los grupos más abundantes en constituyentes y presencia el metanol, alcoholes superiores y ácidos (Lanchenmeier et al., 2006; De León et al., 2008¹; Botello et al., 2007) que pueden llegar a ser tóxicos y están regidos por las normas oficiales mexicanas. Los compuestos con concentraciones más bajas son los ésteres aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos (López, 1999; López y Guevara, 2001; De León et al., 2008¹), que contribuyen al aroma del mezcal. Por su parte el furfural representa un indicador para comprobar que la bebida se obtuvo a partir de agave como materia prima (Gallardo et al., 2008).

Se han identificado aproximadamente 800 componentes en vinos mediante técnicas de detección olfatométrica y cromatografía de gases, de los cuales, se han identificado de 40 a 50 compuestos como los principales agentes responsables de la producción de aromas (Ferreira et al., 2002). Por otra parte algunos estudios han descrito la caracterización de los compuestos volátiles contenidos en el tequila, donde alrededor de 175 diferentes compuestos han sido identificados y se ha observado un alto contenido en alcoholes superiores junto con bajas concentraciones de ésteres, acetales, terpenos, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, fenoles y sulfuros. Se ha reportado que algunas especies de *no-Saccharomyces* tales como *Kloeckera spp.* y *Hanseniaspora uvarum* son conocidas por su aporte en la calidad de compuestos volátiles (Been y Peppard, 1996). La caracterización de la composición de estas bebidas ofrece ventajas en su procesamiento y en sus propiedades sensoriales finales, en la selección de cepas de levaduras por la producción de terpenos (Carrau et al., 2005), en la selección de barricas para los procesos de reposo y añejamiento (Waterhouse y Towey, 1994) y en el efecto de la región de cultivo de la materia prima sobre el contenido de odorantes importantes (Arrhenius et al., 1996). Se presentan a continuación (Tabla 3) algunos compuestos mayoritarios encontrados por López et al., 2012, en tequila utilizando dos cepas de levaduras.

Tabla 3. Comparación de compuestos mayoritarios contenidos en el Tequila blanco de 55 °Alc. vol., elaborado a nivel industrial, con dos levaduras distintas: *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Pan 1.

Compuesto (mg/100 mL)	
<i>K. marxianus</i> UMPe-1	<i>S. cerevisiae</i> Pan1

	No cuantificado	No cuantificado
Etanol		
N-Propanol	75	20
Isobutanol	115	30
Alcohol isoamílico	306	50
2-Pentanol	76	10
Metanol	314	350
Acetaldehído	7.4	10
n-Butanol	2.0	12
Acetato de etilo	2.6	15
Lactato de etilo	3.0	20

Tomado y modificado de: López et al., 2012

Los estudios de Botello et al., (2007) se basan en el análisis químico del mezcal, los cuales analizan un conjunto de diez mezcales comerciales diferentes mediante extracción líquido-líquido con diclorometano y concentrado del extracto orgánico por evaporación. El análisis de los extractos lo realizaron por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS). Identificaron 85 componentes, además identificaron 30 componentes más previamente reportados en la literatura como importantes descriptores de aromas en bebidas alcohólicas. Reportaron concentraciones de cetonas de 1.187 %, ésteres de 17.512 %, alcoholes de 63.54 %, ácidos de 7.685 %, aldehídos de 0.055 %, furanos de 1.930 %, terpenoides de 1.043 %, fenoles de 0.528 % y acetales de 6.511 % aproximadamente. Se muestra un resumen de los porcentajes promedio de áreas por familias químicas encontradas por Botello et al., (2007) en Mezcal (Tabla 4), comparadas con las reportadas por Benn y Peppard, (1996) en un extracto orgánico de tequila. De León et al., (2008)¹ no sólo analizó la caracterización de compuestos volátiles del mezcal, sino también analizaron otras bebidas alcohólicas étnicas de agave como la raicilla, sisal, tequila, bacanora, sotol y pulque por cromatografía de gases-microextracción en fase sólida de espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) (Tabla 5). Identificaron 105 compuestos, de los cuales 11 fueron clasificados como compuestos mayoritarios y los demás como compuestos minoritarios, además indican que diecisiete de estos últimos compuestos pueden ser utilizados como marcadores de la autenticidad ya que son específicos de estas bebidas. El análisis de conglomerados (AC) mostró que las bebidas alcohólicas de agave se pueden distinguir por el análisis multivariado de los compuestos mayoritarios, sin embargo, el análisis de compuestos minoritarios proporciona una mejor toma de huellas dactilares. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en sus estudios.

Tabla 4. Porcentajes de área por familias químicas obtenidas por Cromatografía de gases.

Familia	Mezcal (% Área)	Tequila (Benn y Peppard, 1996) (% Área)
Cetonas	1.187	0.2
Ésteres	17.51	3.85
Alcoholes	63.54	88.45
Ácidos	7.68	1.30
Aldehídos	0.05	0.03
Furanos	1.93	0.85
Terpenoides	1.04	0.64
Fenoles	0.53	0.13
Acetales	6.51	3.15

Tomado y modificado de: Botello et al., 2007

Tabla 5. Concentración de compuestos mayoritarios encontrados en bebidas alcohólicas producidas de diferentes especies de agave. ND = no detectado.

Compuesto	T.R. (min)	γ (mg/L)									
		Mezcal de <i>A. angustifolia</i>	Mezcal de <i>A. duranensis</i>	Mezcal de <i>A. potatorum</i>	Mezcal de <i>A. salmiana</i>	Bacanora	Raicilla	Sisal	Sotol	Tequila	Pulque
Acetato de etilo	4.46	395±3	474±6	492±1	170±0	284±5	166±1	100±2	323±2	221±2	270±5
Metanol	4.63	1024±6	942±3	472±1	1162±4	1065±2	217±3	1826±11	805±7	880±7	ND
Etanol	5.30	307700	370000	290000	307000	339000	315000	307000	315000	362000	39000
2-Butanol	6.66	21±0	17±0	ND	59±0	ND	ND	ND	ND	ND	47±1
Propanol	6.91	612±2	580±1	97±0	708±2	111±0	41±1	163±1	99±1	208±8	ND
2-Methylpropanol	7.87	201±1	307±0	321±0	126±0	294±2	83±1	172±0	50±0	340±1	218±4
1-Butanol	8.64	21±1	22±3	13±2	14±1	ND	ND	ND	35±1	ND	ND
2-(3-)Metil-1-butanol	9.62	472±0	1064±2	589±1	307±1	926±1	350±3	545±1	83±0	1068±10	65±1
Etil-2-hydroxipropanoato	11.72	124±2	265±3	73±1	189±2	ND	ND	ND	ND	77±1	85±2
Ácido acético	13.26	939±6	1192±25	1042±29	638±8	207±2	160±6	441±55	ND	214±47	1530±19
2-Feniletanol	18.82	14±1	18±0	17±0	10±2	23±0	16±1	9±0	ND	23±0.5	64±0
Alcoholes superiores	-	1339±4	2007±1	1037±2	1220±5	1354±1	490±4	888±2	267±1	1638±13	394±4

Tomado y modificado de: De León et al., 2008¹

Como ya se ha mencionado anteriormente, la gran mayoría de los compuestos volátiles están asociados con las especies de levaduras presentes en los mostos de fermentación, por tal motivo varios investigadores han desarrollado estudios relacionadas entre la cepa y los compuestos volátiles producidos, tal es el caso de López et al., (2012), quienes realizaron un análisis comparativo del rendimiento y el contenido de compuestos volátiles producidos durante la fermentación de mostos de agave para tequila, utilizando una levadura aislada de ambientes naturales perteneciente al género *K. marxianus* y otra del género *S. cerevisiae*. Ellos encontraron con *K. marxianus* una velocidad máxima de consumo de azúcares fermentables de 4.79 g/L*h y una producción de etanol de 2.32 g/L*h, acumulando 54.2 g de

etanol/L de mosto después de 72 horas de fermentación; mientras que para la levadura *S. cerevisiae* la riqueza alcohólica acumulada fue de 39.4 g de etanol/L. Los rendimientos de producción alcohólica obtenidos con respecto a la concentración de azúcares fermentables, correspondieron a 96 % para *K. marxianus* y 70 % para *S. cerevisiae*. También identificaron 29 compuestos volátiles en el tequila con *K. marxianus* (por GC-MS), mientras *S. cerevisiae* presentó menor número de compuestos y en menor concentración. Sus resultados sugirieron que la cepa *K. marxianus* es una levadura adecuada para la fermentación, contribuyendo con el mejoramiento de las características organolépticas de la bebida. Estudios similares realizados por Pérez et al., (2013), muestran resultados con concentración de etanol en una muestra destilada de mezcal de 46.75 % y un 1.88 % de metanol utilizando la cepa *K. marxianus* y *Agave cupreata*. Valores similares a los reportados por Díaz et al., 2012, con una concentración de etanol de 30-45 %, utilizando *Agave tequilana* y cepas de levadura *Kloeckera africana*.

2.2 El Agave

En México, los agaves han tenido una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, siendo considerados especies clave en esas regiones, ya que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras, textiles, abono, construcción, implementos agrícolas y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila. Estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, ya que los seleccionaban por sus fibras, por el aguamiel o las elevadas concentraciones de azúcares. Por todo esto los agaves no sólo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva en México, sino también cultural, ya que los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen estas especies (García-Mendoza, 2007; Gentry, 1982; Valenzuela 1997; Nobel, 1998).

2.2.1 Distribución de los agaves en México

México es el centro de origen de la familia *Agavaceae*, a la cual pertenece el maguey, incluye 288 especies, 166 de las cuales son magueyes, agrupados en el género *Agave*. En el país se

han encontrado 125 especies de agaves, lo que representa el 75% del total mundial (Cervantes, 2002). Aunque el mayor número se concentra en Oaxaca (23%), Jalisco es el estado con más riqueza en el occidente de México (García-Mendoza et al., 2004). Otra área con mucha riqueza corresponde a la región ubicada en la provincia del Valle de Tehuacán-Cuicatlán con 15 especies, no sólo conserva una gran riqueza de grupos taxonómicos, sino también filogenéticos (García-Mendoza, 2007). Datos más recientes señalan que existen aproximadamente 200 especies de agave de las cuales 150 se encuentran en México, más 36 especies más que pertenecen a categorías infra específicas, lo cual constituye un total de 186 taxones (García-Mendoza, 2007).

La distribución del género abarca del sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela. Los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; los demás tienen menos de 8 especies (menos del 3% del total). Como ya se mencionó en párrafos anteriores, en México se encuentran más del 75% del género *Agave*, el cual tiene una amplia distribución, sin embargo, ésta es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. Son muy diversos en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las regiones húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Son abundantes en las regiones florísticas de las serranías meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental (García-Mendoza, 2007).

2.2.2 El agave y el mezcal

La producción de bebidas fermentadas y destiladas ha sido una práctica realizada desde la antigüedad por muchas culturas en México, lo cual ha despertado el interés para muchos investigadores, quienes han pretendido explicar sus posibles inicios. En el occidente de Mesoamérica prehispánica, se elaboraban alimentos y bebidas alcohólicas fermentadas de agave con alta relevancia cultural y social. Se ha sugerido que en el occidente de México la destilación de agave se originó en Colima en la época colonial temprana a través de la adaptación de las técnicas introducidas desde Filipinas (Zizumbo-Villarreal et al., 2009). Se han presentado evidencias arqueológicas que confirman la importancia cultural y social de

los agaves en Colima en la época precolombina, uno de los fundamentos de los estudios realizados por Zizumbo-Villarreal et al., (2009), quienes analizaron estructuras de piedra circulares en centros residenciales y ceremoniales de ruinas arqueológicas y los compararon con hornos de piedra actuales utilizados para cocer los agaves en la elaboración de bebidas destiladas. Indican que estas estructuras fueron probablemente usadas para preparar alimentos, incluyendo los agaves. Ellos estudiaron además vasijas de cerámica con representaciones de agaves (fase Colima: 400-600 d. C). Exploraron 5 sitios arqueológicos inexplorados y 2 excavados cercanos a los asentamientos arqueológicos estudiados por Kelly, 1980 en los alrededores de la hacienda Capacha y la ciudad de Cómala, Colima, México, encontrando evidencia arqueológica que indica un alto significado cultural y social de los agaves en Colima, antes del contacto europeo.

Encuestas realizadas por Colunga-GarcíaMarín et al., (2007), mostraron que 74 especies de agave se utilizan en México para producir alimentos, bebidas fermentadas o destiladas, fibras y forraje, de las cuales entre 42 y 53 especies se utilizan exclusivamente para la producción de mezcal en 26 estados de México, siendo recolectadas en su mayoría en los bosques (Torres et al., 2015). De las 14 especies de agave más utilizadas en la elaboración de mezcal, 2 son cultivadas en plantaciones agroindustriales monoespecíficas: *Agave tequilana* (para la producción de tequila) y *Agave angustifolia* (Aguirre y Eguiarte, 2013). Este último es extensamente cultivado en el estado de Oaxaca y es la fuente de producción de la mayoría del mezcal comercial elaborado en México (Conabio, 2006; Gentry, 1982). Las especies restantes son encontradas en diferentes contextos productivos, que van desde las poblaciones silvestres, hasta los agroecosistemas como son los campos de cultivo. Por lo tanto estos sistemas incorporan la mayor parte de la biodiversidad y el conocimiento tradicional asociado a las bebidas espirituosas de agave (Aguirre y Eguiarte, 2013).

El tequila se prepara de *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual no se ha encontrado creciendo en forma silvestre, de hecho, taxonómicamente no es diferente de *Agave angustifolia*, excepto por el mayor tamaño de las hojas, tallos más gruesos y más pesados, panículas difusas con flores largas con pétalos largos en proporción al tubo relativamente corto y al color de las hojas azules en el primero y verde en el segundo (Gentry, 1982). En el

caso del mezcal, la especie de agave cambia dependiendo de la región geográfica del país. Oaxaca es uno de los estados donde se trabaja en mayor escala la elaboración de mezcal, y se utiliza generalmente el “maguey espadín” (*Agave angustifolia*) y en menor medida el “maguey tobarische” (*Agave potatorum*) (Cházaro, 2007).

En las montañas de la Sierra Madre del Sur, en el estado de Guerrero, procesan el *Agave cupreata* para elaborar el mezcal. Como esta actividad se ha venido realizando por decenas de años a partir de plantas silvestres que crecen en el bosque de encino, la materia prima ha disminuido drásticamente en los últimos años. A raíz de esto ONG's (organismos no gubernamentales) iniciaron con la siembra de éste agave en viveros, ya que la especie sólo se reproduce sexualmente (por semillas), no produce hijuelos ni bulbillos y los quíotes generalmente son cortados por los campesinos para concentrar los azúcares en las piñas, por lo que no hay propagación natural (Cházaro, 2007). El *Agave cupreata* se cosecha en los bosques secos tropicales, bosques de robles y otros hábitats de las comunidades rurales en la región de Chilapa, Guerrero, México, para la elaboración de mezcal. Los sistemas de gestión locales, utilizan diversas técnicas para regular la cosecha del agave y estimular la generación, incluyendo la exclusión de ganado (Martin et al., 2011).

Para producir el mezcal, el agave debe ser cosechado antes de la floración para asegurar que las piñas de la planta tengan alta concentración de azúcares (Bahre y Bradbury, 1980; Illsley et al., 2005). Mientras que unas especies de agave pueden reproducirse por clones, otros no, y la cosecha para la producción de mezcal reduce drásticamente el número de plantas (Jiménez-Valdés et al., 2010). En un estudio de mezcal en Sonora, México, se ha documentado el agotamiento de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*, *A. palmeri* y *A. shrevei* debido a la sobreexplotación (Burwell, 1995). Por tales motivos, en varios estados de México se ha mostrado una creciente preocupación por la explotación desmedida algunas especies de agave, como lo han demostrado Aguirre y Eguiarte (2013). Ellos informan que tanto el *Agave cupreata* y *Agave potatorum* son especies que se distribuyen en los bosques tropicales secos en el sur de México y que la extracción de individuos reproductivos para la producción de bebidas espirituosas ha provocado una disminución de las poblaciones silvestres y han expresado preocupación por su conservación a largo plazo. Ellos evaluaron

el grado de la erosión genética de las poblaciones explotadas para proporcionar bases de datos de la genética de poblaciones para el desarrollo sostenible de estrategias de uso de estas especies mediante ISSR (Intersecuencias Simples Repetidas, marcadores nucleares dominantes asociado a los microsatélites). Sus resultados se discuten en relación en el refuerzo in situ de poblaciones basadas en semillas de propagación, en contraste las prácticas de micro propagación pueden poner en peligro la diversidad genética de las especies estudiadas teniendo en cuenta los informes anteriores sobre la diversidad genética. Delgado-Lemus et al., (2014), también evaluaron la distribución y abundancia de *A. potatorum* pero en San Luis Potosí, México, ya que la recolección de esta especie en esa región se realiza antes de la reproducción sexual y la sobreexplotación tiene a esta especie en alto riesgo. Ellos evaluaron las tasas de extracción, las prácticas de manejo y la importancia económica para los hogares de San Luis Potosí, para lo cual utilizaron modelos bioclimáticos para proyectar un mapa de distribución potencial de la especie y un muestreo ecológico para estimar la disponibilidad total de agaves cosechables en el territorio. Además, realizaron observación participativa, encuestas y entrevistas con los productores de agave y mezcal en esa región, con lo cual documentaron los usos del agave, aspectos tecnológicos y socioeconómicos de la producción de mezcal y estimaron las tasas de extracción de agaves. Encontrando que en un área de distribución de casi 608 hectáreas se producen anualmente un promedio de 7, 296 plantas cosechables.

Cada vez es más la demanda de mezcal en México y en otros países del mundo, lo cual ha influido en el riesgo tanto de poblaciones de agave como del mismo mezcal, además de otros factores sociales y ecológicos que también intervienen (Torres et al., 2015). Por ello, es de vital importancia que la cosecha del agave se realice de manera sostenible, permitiendo que las diversas especies de agave tanto silvestres como cultivadas continúen regenerándose para su conservación.

2.3 Tratamiento térmico del Agave

Los fructanos son la principal reserva de polisacáridos de las plantas de agave y se concentran en el tallo y la base de las hojas. Son sintetizados por el metabolismo ácido de las crasuláceas (Cuello et al., 2008) y corresponden a los polímeros u oligómeros formados principalmente

de unidades de fructosa unidas a una molécula de sacarosa (Waleckx et al., 2008). En el agave azul y otras especies de agave, mezclas complejas de fructanos grandes ramificados, donde los restos de fructosa están conectados por enlaces β (2 \rightarrow 1) y β (2 \rightarrow 6), han sido reportados (Waleckx et al., 2008; Waleckx et al., 2011). Las cabezas de agave, que son ricas en fructanos, se cuecen en hornos o autoclaves tradicionales para hidrolizarlos y liberar los azúcares fermentables (monómeros u oligosacáridos con menores grados de polimerización), principalmente fructosa, glucosa, xilosa y maltosa (Cuello et al., 2008). Después de completado el tratamiento térmico, las cabezas de agave son molidas para obtener los jarabes ricos en azúcares fermentables, para que sean susceptibles a la acción microbiana mediante el proceso de fermentación. Cuando las cabezas de agave se cuecen en hornos tradicionales por leña, el proceso tarda de 2 a 3 días. Alternativamente en hornos calentados por vapor de agua a temperaturas cercanas a 100 °C, el proceso de cocción se completa dentro de 8 a 12 horas (Secretaría de economía, 2006). Nattorp et al., (1999) encontró que la despolimerización de los polisacáridos por hidrólisis comienza con la protonación del oxígeno glucosídico, seguido por la rotura del enlace glicosídico, lo que resulta en la formación de un carbocatión cíclico. El carbocatión se estabiliza por un par de electrones en una molécula de agua, y dos nuevas moléculas se forman durante el proceso de despolimerización.

2.3.1 Los furanos

Se han encontrado además una gran cantidad de compuestos químicos generados durante la cocción del agave. Mancilla y López, (2002), supervisaron la producción de compuestos volátiles durante la cocción del agave azul por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) y observaron una gran variedad de compuestos que incluyen alcoholes, aldehídos, ácidos aminados, furanos, ácidos orgánicos, piranos, compuestos de azufre, terpenos y furanonas, así como productos volátiles del tratamiento térmico de agave, tales como alcohol feniletílico, vainillina, α -damascenona y linalol, los cuales son una fuente de las características organolépticas de tequila (Benn y Peppard, 1996). También se ha estudiado la formación de furanos durante la cocción, estos son derivados de la degradación térmica de las hexosas y pentosas, y el furano más abundante formado durante la cocción de las cabezas de agave es el 5-(hidroximetil) furfural (HMF). Sárvári et al., (2003), sugirieron que la

capacidad de las levaduras para conferir furanos en compuestos menos tóxicos es un criterio fundamental para la selección de los microorganismos utilizados en la producción de etanol. Además, el furfural, 2-furanmetanol, y ácido 2-furanocarboxílico también son comúnmente producidos durante el tratamiento térmico del agave (Mancilla y López, 2002). Modig et al., (2002), encontraron que altas concentraciones de furfural inhibían enzimas esenciales como la piruvato-deshidrogenasa y la aldehído-deshidrogenasa. Bajo condiciones anaeróbicas, las levaduras metabolizan el furfural a alcohol furfurílico; sin embargo, en condiciones aeróbicas, el ácido furanoico es producido y HMF es metabolizado para formar alcohol furfurílico 5-(hidroximetil) (Palmqvist y Hahn, 2000). El furfural y HMF tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol en el proceso fermentativo (Palmqvist y Hahn, 2000). Palmqvist et al., 1999, encontró que la adición de furfural a cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* causa una disminución en la replicación celular sin inhibir la actividad celular (inactivación replicativa). La ausencia de producción de glicerol durante la reducción de furfural sugiere que el furfural actúa como un factor redox alternativo y se oxida el exceso de NADH formado durante la biosíntesis (Botello et al., 2011).

Por otra parte, los estudios realizados por Palmqvist y Hahn, (2000), revelan que la concentración de furfural de 1.922 g/L reduce la velocidad de crecimiento específico de *S. cerevisiae* en un 30 % y además reduce la producción de alcohol un 66 %. A pesar de que una concentración de furfural de 5.093 g/L inhibe completamente el crecimiento celular, concentraciones similares de alcohol furfurílico no afectan significativamente la fermentación. Alternativamente en un estudio llevado a cabo por Choteborka et al., (2004), una concentración de furfural de 6.27 g/L y una concentración de HMF de 0.2 g/L no dio lugar a una inhibición significativa.

2.3.2 Las saponinas

La hidrólisis térmica de agave no solamente se realiza en hornos subterráneos a base de piedras y leña, proceso artesanal, sino que también puede realizarse en autoclaves u hornos de mampostería que realizan su función de hidrólisis térmica a base de vapor, aun así se forman compuestos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento celular, tal como lo comprobó

Zamora, et al., (2010) quienes analizaron la cocción de agave con vapor, proceso en el que se genera gran cantidad de efluvios ricos en carbohidratos fermentables que regularmente son desechados por la presencia de saponinas, ya que pueden influir de manera negativa en la fermentación. Ellos obtuvieron muestras de efluvios cada 3 h durante el tiempo de cocción de las cabezas enteras de agave y se les midió el pH, temperatura, sólidos totales y abundancia de saponinas por la espuma durante agitación. La concentración de azúcares reductores la obtuvieron por método de Fehling-Soxhlet y por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). La cuantificación de saponinas la realizaron por el método descrito por Baccou, 1977, registrando una disminución gradual del pH, de la concentración de saponinas y un incremento en los azúcares reductores. Así como una tendencia similar entre las dos técnicas para saponinas.

2.3.3 Optimización de la hidrólisis térmica del agave

Estudios realizados para el tratamiento térmico óptimo de agave también se han desarrollado. Botello et al., (2011), estudiaron las cinéticas de la hidrólisis de los fructanos del *Agave salmiana* durante la etapa de cocción de mezcal en un autoclave escala piloto. La hidrólisis térmica la llevaron a cabo en un rango de temperatura de 96 a 116 °C y tiempos de cocción de 20 a 80 horas. Sus resultados indicaron que la hidrólisis térmica del agave fue óptima en un rango de temperatura de 106-116 °C con tiempos de cocción de 6-14 horas. Las condiciones óptimas correspondieron a una hidrólisis de fructanos del 80 %, produciendo jarabes con concentraciones de furanos y azúcares reductores de 1 ± 0.1 y 110 ± 10 g/L.

La cocción de las cabezas de agave es una reacción heterogénea en una matriz vegetal junto con el calor y el transporte de masa. Modelos rigurosos requieren una comprensión completa y caracterización de las reacciones de depolimerización y degradación, así como ecuaciones de la formulación de calor y transferencia de masa. Las propiedades térmicas de las cabezas de agave son desconocidas pero otros procesos similares se han estudiado mediante el empleo de modelos simplificados que describen los datos experimentales. En estos modelos simplificados, la matriz vegetal se considera que es un sistema homogéneo y sin restricciones de transporte. La hidrólisis y reacciones de degradación se consideran reacciones concentradas (Botello et al., 2011).

Durante el proceso de cocción de las piñas de agave, se producen compuestos volátiles, compuestos de Maillard, además de los azúcares fermentables (fructosa y glucosa). Estos compuestos aunados a los producidos durante el proceso de fermentación asociados a la levadura usada o especies levaduriformes presentes pueden tener un impacto significativo sobre las características de la bebida alcohólica (Mancilla y López, 2002; Arrizon et al., 2006; Díaz, 2008; Pinal et al., 2009).

Aunque el tratamiento térmico de agave es un paso clave en la producción de mezcal, el proceso no ha sido completamente investigado y las relaciones entre las condiciones de funcionamiento, el grado de hidrólisis, la generación de furanos y el efecto de estos en la fermentación no han sido todavía examinados. Por otra parte las Normas Oficiales Mexicanas sobre las bebidas alcohólicas requieren que la concentración de furfural debe ser inferior a 4 mg/100 mL de etanol anhidro (Secretaría de Economía, 2006; Secretaría de Salud, 1996). Para promover la comercialización internacional de mezcal, estas restricciones deben ser estrictamente forzadas (Botello et al., 2011).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La elaboración de mezcal es una de las actividades tradicionales llevadas a cabo en diversos municipios del estado de Michoacán, donde utiliza principalmente como materia prima el *Agave cupreata*. El proceso de producción es artesanal en su mayoría y por muchos años se ha traducido como informal debido a diversos factores que aquejan el sector. En primera instancia, la fermentación es llevada a cabo de manera natural y espontánea, lo cual es una práctica común en la mayoría de los municipios productores y se traduce en un menor rendimiento y calidad sensorial debido a las variaciones entre cada lote, ocasionado por la gran cantidad de microorganismos presentes en los mostos, que van desde levaduras, bacterias y hongos. Existen además otros factores en el proceso que influyen directamente con las características finales del producto, como son, la ausencia de inóculo, la falta de esterilidad y asepsia en las áreas de producción, la estandarización del proceso, las diferentes calidades de la materia prima utilizada, la falta de estandarización del producto, así como la falta de tecnología lo que supone la utilización de sistemas clásicos para la conducción de las fermentaciones alcohólicas. Aun así, en 2012 se incorporó el estado de Michoacán en la declaratoria de la Denominación de Origen del mezcal en México, lo que dificultará enormemente la comercialización de la bebida, ya que existe además un Consejo Regulador (COMERCAM) como parte de la estructura de la Denominación de Origen, que propone múltiples acciones de control y verificación a lo largo de la cadena de producción, y de implementarse, harán muy difícil, casi imposible, la sobrevivencia de las pequeñas fábricas campesinas, a favor de las fábricas más industrializadas que sólo pueden ser establecidas por empresarios. Es importante que esta actividad sea revalorada para convertirse en el corto y mediano plazo en una agroindustria rentable, que sirva como detonante para el desarrollo de actividades como la explotación racional del recurso, fomentar la producción, industrialización y comercialización de la bebida. Sin embargo, para el logro de estos objetivos, deben resolverse una serie de añejos problemas que aquejan al sector, comenzando por la regularización de la actividad y la organización de los productores, para que a través de las distintas instancias de gobierno gestionen los apoyos necesarios para la consolidación de esta actividad. Además de la estandarización y control en sus procesos de producción que les permitan obtener productos de calidad que cumplan con las especificaciones de las normas reguladoras de la bebida.

4. HIPÓTESIS

Es posible mediante el análisis cinético y químico de cultivos puros y mixtos de levaduras, evaluar de manera simultánea las variables involucradas en el proceso de fermentación y establecer la influencia de cada una de ellas sobre las variables de respuesta de interés.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar cinética y fermentativamente las cepas de levaduras aisladas de fermentos espontáneos en cultivos puros y mixtos mediante diseños experimentales y evaluar la producción de compuestos volátiles generados.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar experimentalmente los parámetros cinéticos de los sistemas de fermentación (T_d , δ , μ , $\mu_{m\acute{a}x}$, $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, λ).
2. Determinar las variables de salida del proceso: variación de pH, consumo de azúcares, crecimiento celular, peso seco y producción de etanol.
3. Estudiar los cultivos mixtos de las cepas seleccionadas nivel biorreactor.
4. Destilar y rectificar los ensayos de cultivos mixtos y determinar su grado alcohólico.
5. Determinar acidez total y extracto seco.
6. Identificar y cuantificar la composición de compuestos volátiles: aldehídos, ésteres, metanol, etanol y alcoholes superiores.
7. Aplicación de las Normas reguladoras del mezcal para evaluar el índice de calidad de la bebida.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se describen a continuación los materiales y métodos que fueron utilizados para realizar el trabajo experimental. Para el análisis químico, los procedimientos se llevaron a cabo bajo las Normas Mexicanas dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 (bebidas alcohólicas-Mezcal), además de otras más presentes dentro de la NOM-006-SCFI-2005 (bebidas alcohólicas-Tequila) por no estar presentes en la NOM reguladora del mezcal pero que son relevantes para el análisis completo del producto.

6.1 Microorganismos

Se utilizaron tres cepas de levaduras no *Saccharomyces*: *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Zygosaccharomyces bailii*, además de una cepa más perteneciente al género *Saccharomyces cerevisiae*. Todas fueron aisladas de fermentos espontáneos para la elaboración de mezcal en el municipio de Villa Madero, Michoacán, y se encuentran caracterizadas molecularmente por RFLP (Damián et al., 2012).

6.2 Fuente de sustrato

Se utilizó como sustrato jugo de *Agave cupreata*, de un mismo lote de cultivo, con una edad de madurez promedio de 8 años con origen de Etúcuaro, Michoacán, previamente hidrolizado y filtrado para su uso posterior.

6.3 Medios de cultivo

6.3.1 Para la conservación de las cepas

Las cepas seleccionadas se sembraron en medio sólido enriquecido YPD.

6.3.2 Para la propagación de las cepas

Para la propagación de las cepas se utilizó jugo de agave previamente filtrado al vacío y ajustado a 12 ° Brix, se adicionó $(\text{NH}_4)_2 \text{H}_2\text{PO}_4$ a una concentración de 1 % y se ajustó el pH a 5.

6.4 Formulación de inóculo

Mediante un asa de cultivo se tomaron 2 asadas de colonias frescas de la cepa a estudiar presentes en las cajas de Petri y se inocularon en 100 ml del medio de propagación, esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, manipulando en una campana de flujo laminar todos los materiales.

6.5 Análisis de las variables de los cultivos puros

Para evaluar los factores y los niveles de operación de cada uno de los cultivos puros se construyó un Diseño Experimental Factorial fraccionado 2^{4-1} nivel matraz con tres réplicas en el punto central, utilizando el software Statgraphics plus para la formulación y análisis del diseño. Se establecieron como variables independientes, A: Temperatura (25, 30 y 35 °C), B: Concentración inicial de azúcares (10, 12 y 14 °Brix), C: pH (4.5, 5 y 5.5) y D: Concentración celular inicial (1, 2 y 3 millones de células/ml).

6.6 Análisis de las variables de los cultivos mixtos

Para evaluar las variables y los niveles de operación nivel biorreactor se se construyó un diseño de mezclas Simplex-Centroide con 3 componentes (3 levaduras), utilizando una agitación de 150 rpm y una aireación de 0.1 vvm (Pérez et al., 2013).

6.7 Determinación de las variables de respuesta

6.7.1 Crecimiento celular

Se colocaron en tubo eppendorf de 1.5 ml, 100 µl de muestra del fermento, 800 µl de agua destilada y 100 µl azul de metileno (dilución 1:10) para teñir las células no viables, posterior a esto se agitó la dilución y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer (Loptik, Labor).

6.7.2 Consumo de azúcares

La cuantificación de azúcares se realizó mediante la técnica colorimétrica utilizando el reactivo DNS (ácido 3'-5'-dinitrosalicílico).

6.7.3 Peso seco

Se tomó 1 ml de mosto fermentado en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó por un minuto. Se desechó el sobrenadante utilizando una micropipeta cuidando en no llevarse las células las cuales se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y nuevamente se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y se agregó nuevamente 1 ml de agua destilada, resuspendiendo las células y colocándolas en charolas de aluminio a masa constante (previamente pesadas) con ayuda de una micropipeta para evitar pérdidas, se evaporaron en un horno con regulador de temperatura controlada 40 ± 5 °C hasta casi sequedad, cuidando que la muestra no llegara a su punto de ebullición para evitar proyecciones. Se mantuvo el material con el residuo en el horno pero ahora a una temperatura de 100-105 °C durante el tiempo necesario. Se trasladó el material a un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Se pesó el material conteniendo el extracto seco, y se registró la masa hasta décimas de miligramo.

6.7.4 pH

Para determinar el pH, se tomaron muestras de 2 ml del medio de fermentación en tubos falcón de 10 ml y mediante un potenciómetro (Hanna instruments) previamente calibrado se determinó la variación de pH durante la fermentación.

6.7.5 Etanol en mosto

Se utilizó un cromatógrafo Varian 3800®, con detector FID (flame ionization detector). La cantidad de inyección de las muestras y las diluciones de calibración fue de 1 µl. Se inyectaron todas las muestras obtenidas para cada fermentación, previamente filtradas para evitar bloqueos de la columna capilar del cromatógrafo y finalmente se identificaron los tiempos de retención, así como las áreas de los componentes identificados para su posterior cuantificación mediante una curva de calibración (etanol-agua).

6.8 Destilación de los productos de fermentación

Al volumen de mosto obtenido al final en la etapa de fermentación se le realizó una doble destilación en un rota-vapor. Para ello se utilizó un matraz de destilación de 1L, en cada carga se colocaron 500 ml del mosto fermentado (mosto muerto) el cual se destiló a una temperatura de 85 °C a 90 rpm durante 30 minutos.

6.9 Determinación de contenido alcohólico (% Alc. Vol.)

Método volumétrico (Alcoholímetro) (NMX-V-013-NORMEX-2005).

6.10 Determinación de extracto seco

Método gravimétrico (NMX-V-017-NORMEX-2005).

6.11 Determinación de acidez total

Método por titulometría (NMX-V-015-NORMEX-2006).

6.12 Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores

Por cromatografía de gases (NMX-V-005-NORMEX-2005).

Tabla 6. Concentraciones recomendadas para la preparación de las soluciones concentradas (NMX-V-005-NORMEX-2005).

Componente	Concentración en g/100 ml de disolución en alcohol a 40% Alc. Vol. (pH=8.5)
Acetaldehído	0.16
Metanol	1.20
s-butanol	0.20
n-propanol	0.60
i-butanol	0.60
i-amílico	0.60
n-amílico	0.60
Acetato de etilo	0.30
Lactato de etilo	0.30

Tabla 7. Concentraciones recomendadas para preparar las diluciones de calibración.
Concentración (mg/100ml).

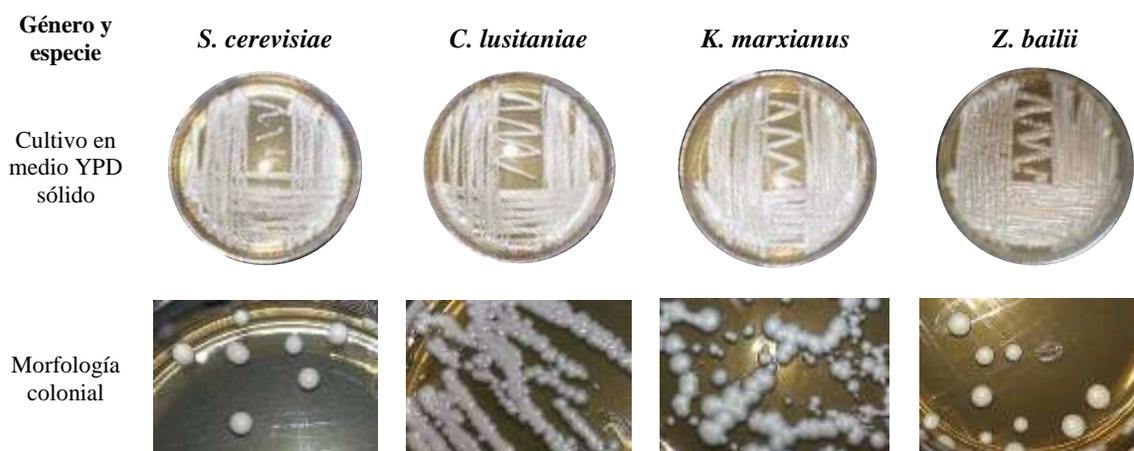
Solución concentrada (ml)	Acetaldehído	Metanol	s-Butanol	n-Propanol	Iso-Butanol	n-Butanol	Iso-Amflico	n-Amflico	Acetato de etilo
1	1.60	12	2	6	6	2	6	6	3
2	3.20	24	4	12	12	4	12	12	6
3	4.80	36	6	18	18	6	18	18	9
4	6.40	48	8	24	24	8	24	24	12
5	8.00	60	10	30	30	10	30	30	15
6	9.60	72	12	36	36	12	36	36	18
7	11.2	84	14	42	42	14	42	42	21
8	12.8	96	16	48	48	16	48	48	24
9	14.4	108	18	54	54	18	54	54	27
10	16.0	120	20	60	60	20	60	60	30

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Cepas de estudio

Las cepas de levadura seleccionadas fueron resembradas periódicamente en medio YPD sólido para mantenerlas frescas y viables. Se conservaron además en medio YPD líquido más glicerol (1:1) a -20 °C. Las colonias frescas para la formulación de los preinóculos se tomaron de placas con un máximo de 2 semanas de su resiembra. A continuación se muestran los cultivos en placa de las cepas a estudiadas.

Tabla 8. Cultivos de las cepas en medio sólido YPD.



En la tabla 9 se describen las características morfológicas de cada cepa. Además se realizó la observación microscópica donde se pudo observar la diferencia en cuanto a tamaño y gemación de cada cepa.

Tabla 9. Características morfológicas de las levaduras seleccionadas

Nombre	Tamaño	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Densidad	Consistencia
<i>S. cerevisiae</i>	2 mm	Circular	Pulvinada	Entero	Beige	Mate	Opaca	Cremosa
<i>C. lusitaniae</i>	1.7 mm	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Brillante	Opaca	Cremosa
<i>K. marxianus</i>	1.4 mm	Irregular	Elevada	Entero	Blanco	Mate	Opaca	Cremosa
<i>Z. bailii</i>	1.5 mm	Irregular	Aplastada	Rizado	Blanco	Brillante	Opaca	Cremosa

Fuente: Damián et al., 2012.

7.2 Hidrólisis térmica del agave

Se recolectó *Agave cupreata* de un predio registrado, para utilizarlo como fuente de azúcares en la formulación de los medios de cultivo para las fermentaciones. A continuación (Tabla 10), se muestran las características de dicha planta.

Tabla 10. Características de la materia prima.

Características	
Género	<i>Agave cupreata</i>
Edad de la planta	8 años
Área del lote de cultivo	400 m ²
Origen	Ucaziro, Municipio de Villa Madero

La hidrólisis térmica del agave se llevó a cabo en autoclave (Felisa) a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lb/in². El extracto obtenido se ajustó a 14 °Brix y se le realizó la medición de azúcares reductores totales mediante la técnica colorimétrica con ácido 3'-5'-dinitrosalicílico (DNS) (Tabla 10).

Tabla 11. Hidrólisis térmica del Agave.

Tiempo (h)	Azúcares Reductores Totales (g/L)
6	65.38
8	121.46

Obtenidos estos resultados, se eligió como tiempo de hidrólisis 8 horas, tiempo suficiente para obtener la concentración ideal de azúcares reductores totales para llevar a cabo las fermentaciones. También se utilizó agave previamente hidrolizado en hornos artesanales de piedra de una región productora de mezcal, con un tiempo de cocción de 1 semana. Éste agave se utilizó para llevar a cabo las fermentaciones en biorreactor, por requerir en estos ensayos de mayores volúmenes de operación.

7.3 Análisis de cultivos puros

Para la caracterización cinética de los cultivos puros, se aplicó el diseño experimental fraccionado 2^{4-1} , nivel matraz (Tabla 11).

Tabla 12. Resumen y base del diseño Factorial fraccionado 2^{4-1} .

Resumen del diseño			
Clase del diseño	Screening		
Nombre del diseño	Factorial fraccionado		
Base del diseño			
Número de factores experimentales	4		
Número de respuestas	1		
Puntos centrales	3		
Número de corridas	11		
Factores experimentales	Niveles		
	Bajo	Intermedio	Alto
Temperatura (°C)	25	30	35
Azúcares iniciales (°Brix)	10	12	14
Ph	4.5	5	5.5
Inóculo (millones/ml)	1	2	3

Tabla 13. Matriz de ensayos, Diseño Experimental Factorial fraccionado 2^{4-1} .

Ensayo	T (°C)	Azúcares (°Brix)	pH	Inóculo (células/ml)/10 ⁶
1	25	10	4.5	1
2	35	14	4.5	1
3	25	14	4.5	3
4	35	14	5.5	3
5	25	14	5.5	1
6	30	12	5.0	2
7	35	10	4.5	3
8	25	10	5.5	3
9	35	10	5.5	1
10	30	12	5.0	2
11	30	12	5.0	2

7.3.1 Análisis de variables de respuesta.

La concentración de etanol se determinó directamente al mosto, para evaluar la producción de éste compuesto durante la fermentación. Para ello se inyectaron al cromatógrafo de gases las muestras previamente centrifugadas y filtradas, en la Tabla 12 se presentan el resultado máximo reportado tomado entre la hora 24-56, ya que si se consideraba una hora fija para tomar el valor se mostraba mucha variabilidad entre ensayos y no se lograría un análisis ideal de éste parámetro en su máxima concentración. Se determinó además como variable de respuesta el crecimiento celular para conocer la producción de biomasa de cada cepa durante la fermentación y obtener datos para el análisis cinético.

Tabla 14. Variables de respuesta de los Diseños Factoriales fraccionados 2^{4-1} de cultivos puros. Las condiciones de cada ensayo se presentan en Tabla 12.

Ensayo	<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. lusitanea</i>		<i>K. marxianus</i>		<i>Z. bailii</i>	
	Células/ml	Etanol (% v/v)						
1	3.485x10⁸	2.67	5.075x10 ⁸	4.42	4.490x10⁸	2.67	3.835x10 ⁸	3.81
2	1.645x10 ⁸	5.77	3.600x10 ⁸	4.24	2.475x10 ⁸	7.30	2.790x10 ⁸	4.42
3	2.625x10 ⁸	2.38	5.075x10 ⁸	5.13	3.255x10 ⁸	2.42	3.255x10 ⁸	3.27
4	1.520x10 ⁸	4.08	3.600x10 ⁸	4.67	3.005x10 ⁸	6.21	2.395x10 ⁸	3.72
5	1.635x10 ⁸	5.90	5.625x10⁸	3.00	3.545x10 ⁸	2.65	4.280x10⁸	3.91
6	1.320x10 ⁸	3.31	4.205x10 ⁸	3.43	2.665x10 ⁸	4.99	2.435x10 ⁸	5.91
7	1.395x10 ⁸	3.04	3.725x10 ⁸	2.14	3.180x10 ⁸	4.26	1.820x10 ⁸	2.4
8	1.880x10 ⁸	5.24	3.900x10 ⁸	2.56	3.975x10 ⁸	4.66	3.095x10 ⁸	2.51
9	2.060x10 ⁸	5.96	3.875x10 ⁸	3.09	3.745x10 ⁸	1.47	3.725x10 ⁸	3.97
10	1.960x10 ⁸	4.90	4.450x10 ⁸	3.98	3.745x10 ⁸	5.37	2.750x10 ⁸	4.58
11	2.170x10 ⁸	3.69	4.225x10 ⁸	4.53	3.035x10 ⁸	4.19	2.910x10 ⁸	5.24

Obtenidos los datos en la tabla anterior se procedió a realizar el análisis estadístico de cada uno de los diseños. Por lo general, la fermentación dura alrededor de 24 a 96 h, a temperaturas entre 30 y 35° C, y la concentración final de etanol en el mosto fermentado es de aproximadamente 30 a 90 g/L (Cedeño 1995). También es importante analizar los factores que afectan el proceso de fermentación, tales como el contenido de azúcares, pH, minerales, la temperatura, la cepa de levadura, el método usado y el contenido de otros componentes añadidos a los fermentos (López et al. 2012).

7.4 Seguimiento cinético

Se realizó el monitoreo cinético de cada tratamiento durante 50 h aproximadamente, muestreando cada 2 h al principio de la fermentación y posteriormente cada 4 horas. Se determinaron las variables de respuesta de las cuales se construyeron las cinéticas de crecimiento celular, de consumo de azúcares, de peso seco y de variación de pH.

7.4.1 Crecimiento celular y consumo de azúcares

En todos los ensayos se utilizó jugo de agave como fuente de azúcares. Para la determinación de parámetros cinéticos las condiciones de cultivo fueron las pertenecientes a los puntos centrales: 30 °C, 12 °Brix, pH = 5 y concentración de inóculo de 2 millones de células/ml, condiciones casi ideales para la fermentación según lo informado por algunos autores, quienes a través de la metodología de superficie de respuesta reportan valores muy similares (De León et al., 2008²; Pérez et al., 2013). Para la obtención de los datos de azúcares reductores totales se construyó una curva de calibración (Ec. 4) mediante la cual se interpolaron los datos de absorbancia obtenidos para cada uno de los puntos que conformaban cada cinética experimental.

$$Y = 5.8622x + 0.012; R^2 = 0.9996 \quad (10)$$

Se muestran a continuación los gráficos obtenidos para éstas determinaciones:

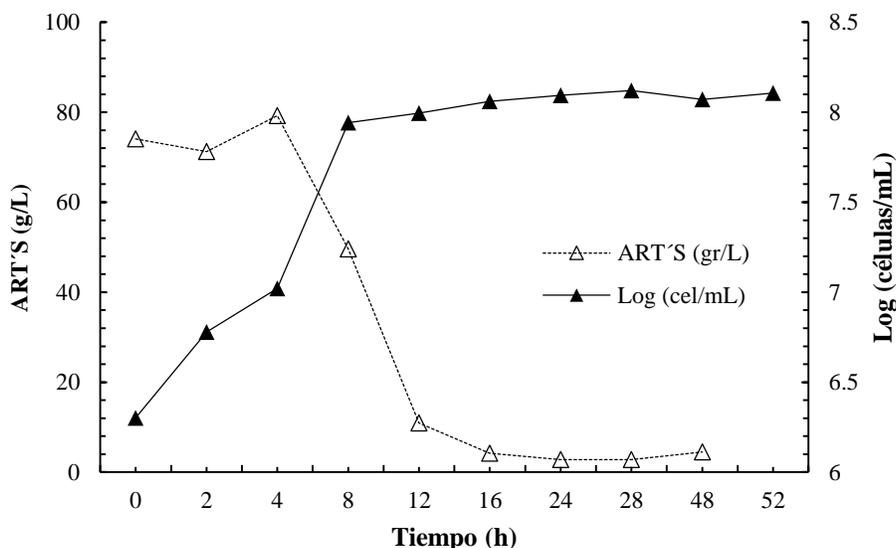


Figura 1. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *S. cerevisiae*.

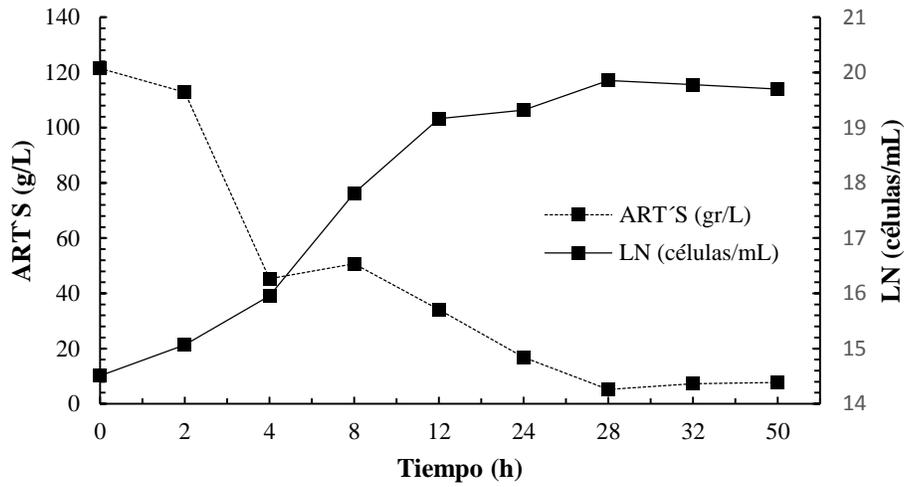


Figura 2. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *C. lusitanaea*.

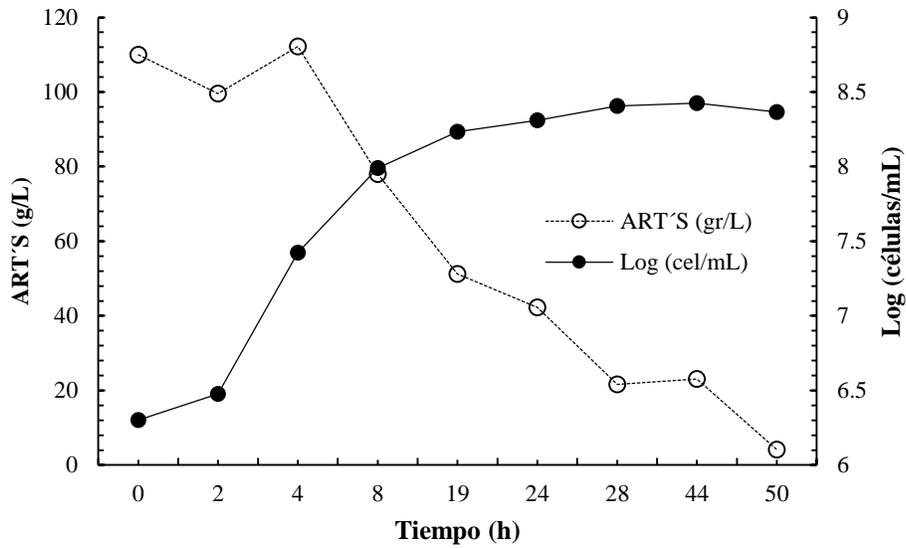


Figura 3. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *K. marxianus*.

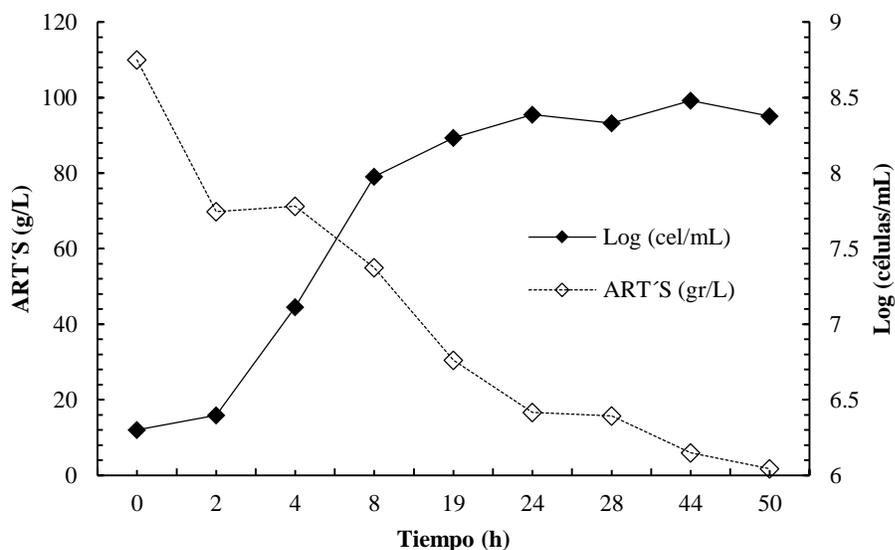


Figura 4. Cinética de crecimiento celular y consumo de azúcares para *Z. bailii*.

Los resultados experimentales mostraron que la cepa pertenece al género *C. lusitaniae* exhibió el mayor crecimiento celular, siendo 5.625×10^8 células/ml. Mientras que *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, y *Z. bailii* alcanzaron crecimientos de 3.485×10^8 células/ml, 4.490×10^8 células/ml y 4.280×10^8 células/ml, respectivamente (Tabla 13). Estos resultados demuestran que el crecimiento de las levaduras no-convencionales es similar o incluso mayor al presentado por *S. cerevisiae*, resultados también confirmados por Segura et al., (2015), quienes reportaron poblaciones finales en jugo de agave en un rango de 6.90×10^7 células/ml a 3.13×10^8 células/ml, donde la cepa con el mayor crecimiento fue *P. Kluyveri* comparada con *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.

Al analizar las curvas de crecimiento, se observa que *S. cerevisiae* no presentó fase de latencia o de ajuste al medio de cultivo (Figura 1); esto porque el medio del inóculo era muy similar al de los tratamientos, además porque la muestra para inocular se tomó en fase logarítmica. En contraste, *C. lusitaniae* (Figura 2), *K. marxianus* (Figura 3), y *Z. bailii* (Figura 4) presentaron una fase de adaptación de 2 a 4 h. La fase de crecimiento exponencial concluyó aproximadamente a las 13 h para *S. cerevisiae* (Figura 1), y 24 h para *C. lusitaniae* (Figura 2) *K. marxianus* (Figura 3) y *Z. bailii* (Figura 4), lo que indica que las levaduras no-convencionales son adaptativas y de crecimiento más lento en comparación con *S. cerevisiae*.

De acuerdo con la literatura (Querol et al., 1990), *C. lusitaniae*, *K. marxianus* y *Z. Bailii* proliferan en los primeros días de fermentación favorecidos por el bajo contenido de alcohol en los mostos.

El consumo de azúcares reductores por parte de *S. cerevisiae* fue más rápido respecto a las cepas no-convencionales, el consumo de casi todos los azúcares presentes en el medio para esta cepa se observó a las 16 horas de iniciada la fermentación (Figura 1). *C. lusitaniae* consume la mayor parte de los azúcares reductores en alrededor de las 28 horas (Figura 2), y *K. marxianus* (Figura 3) y *Z. bailii* (Figura 4) requiere aproximadamente 50 horas para consumir la mayoría de los azúcares. Estos resultados son consistentes con los reportados por Segura et al., (2015), quienes encontraron que después de 36 h de fermentación, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* había consumido casi todo el azúcar presente en el medio de jugo de agave, mientras que *P. kluyveri* tardó 48 h para lograr este consumo.

7.4.2 Variación de pH

En lo que respecta a la acidificación del medio, *S. cerevisiae* y *C. lusitaniae* concluyeron la fermentación a un pH de 4.2, mientras que *Z. bailii* y *K. marxianus*, concluyeron la etapa con valores de 3.79 y 3.73 respectivamente; estos valores de pH se correlacionan con el contenido de ácido acético producido en los mostos, como reportaron Ramírez y Molina, (2008) para *S. cerevisiae*, con valores finales de pH de 3.5 y 4.

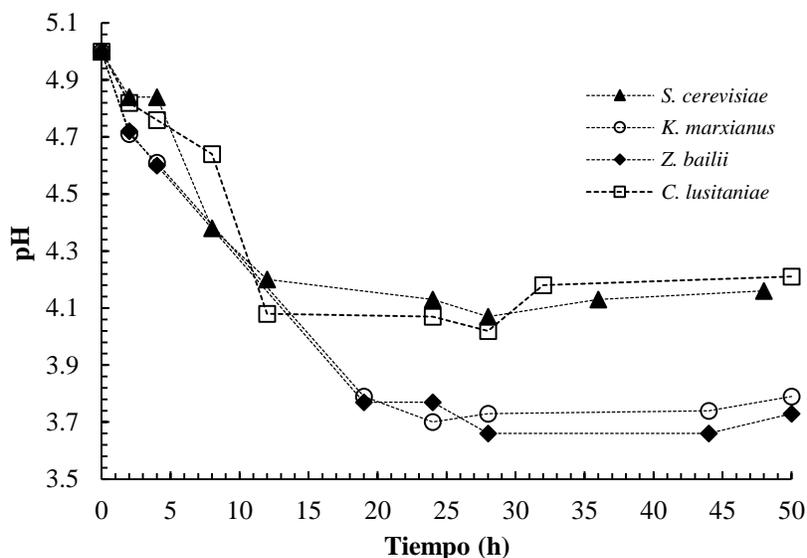


Figura 5. Acidificación del medio cultivo respecto al tiempo de fermentación.

7.4.3 Etanol

Se determinó la concentración de etanol en el mosto durante cada cinética de fermentación, el análisis se realizó mediante cromatografía de gases con detector FID. Para obtener las mediciones se construyó una curva de calibración (etanol-agua) (Figura 6).

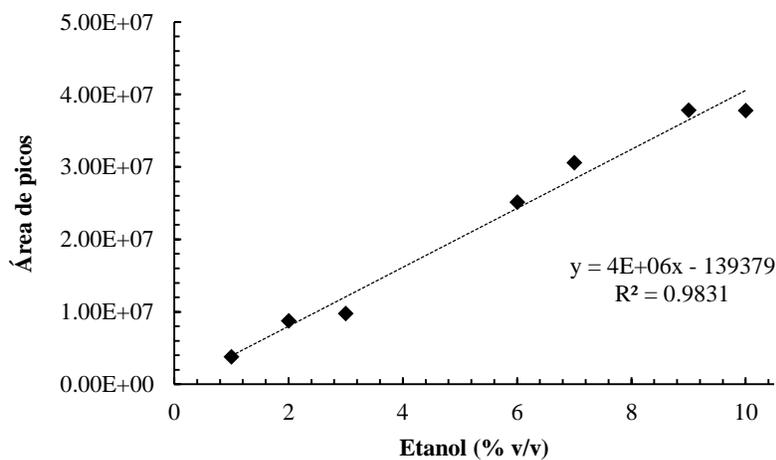


Figura 6. Curva de calibración etanol-agua

En la siguiente tabla se observa la cantidad de etanol producido en cada ensayo con las 4 cepas estudiadas, se presentan los resultados tanto en % v/v como en g/L.

Tabla 15. Concentraciones de etanol producido en los Diseños Factoriales fraccionados 2^{4-1} de cultivos puros. Las condiciones de cada ensayo se presentan en Tabla 12.

Ensayo	<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. lusitanea</i>		<i>K. marxianus</i>		<i>Z. bailii</i>	
	Etanol (% v/v)	Etanol (g/L)	Etanol (% v/v)	Etanol (g/L)	Etanol (% v/v)	Etanol (g/L)	Etanol (% v/v)	Etanol (g/L)
1	2.67	21.10	4.42	34.93	2.67	21.11	3.81	30.07
2	5.77	45.61	4.24	33.46	7.30	57.67	4.42	34.88
3	2.38	18.78	5.13	40.53	2.42	19.13	3.27	25.85
4	4.08	32.26	4.67	36.89	6.21	49.06	3.72	29.35
5	5.90	46.59	3.00	23.72	2.65	20.96	3.91	30.89
6	3.31	26.12	3.43	27.11	4.99	39.38	5.91	46.69
7	3.04	24.00	2.14	16.89	4.26	33.65	2.4	18.96
8	5.24	41.37	2.56	20.19	4.66	36.82	2.51	19.83
9	5.96	47.10	3.09	24.38	1.47	11.62	3.97	31.39
10	4.90	38.72	3.98	31.42	5.37	42.43	4.58	36.18
11	3.69	29.13	4.53	35.80	4.19	33.13	5.24	41.40

7.5 Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se determinaron en los ensayos con las condiciones de los puntos centrales (Tabla 16) con un valor de $n=3$.

Tabla 16. Valores de puntos centrales de factores experimentales.

Factor experimental	Valor central
Temperatura (°C)	30
Concentración inicial de azúcares (°Brix)	12
pH	5
Concentración inicial de inóculo (células/mL)/ 10^6	2

7.5.1 Ajuste de los datos mediante modelo logístico

Para la determinación de los parámetros cinéticos, los datos obtenidos de crecimiento celular de cada cepa se ajustaron a un modelo logístico (Zwietering y *col.*, 1990), descrito por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right]\right\}} \quad (11)$$

Dónde:

A = máximo crecimiento celular

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento

λ = fase de adaptación

t = tiempo

Estas determinaciones se realizaron por triplicado (n=3), en la Figura 7 se muestran los datos ajustados al modelo para una sola réplica de cada cepa.

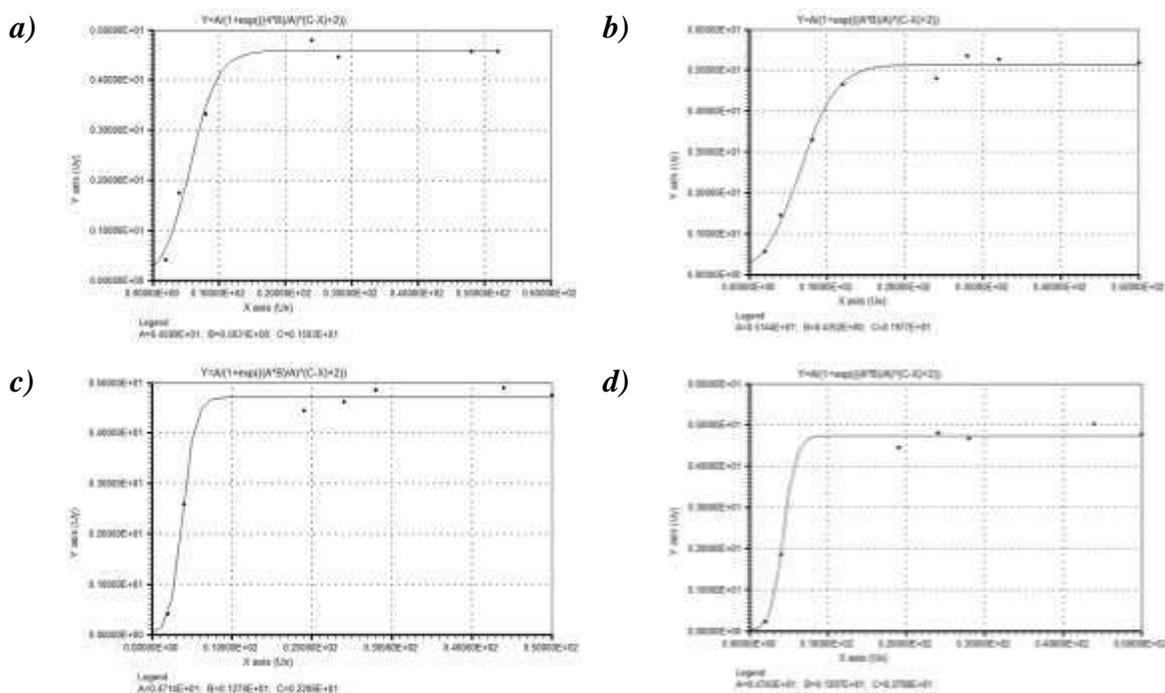


Figura 7. Gráficos obtenidos del ajuste de datos mediante el método logístico para: (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitaniae*, (c) *K. marxianus* y (d) *Z. bailii*.

Tabla 17. Parámetros cinéticos obtenidos del modelo logístico. μ_{max} = Velocidad máxima de crecimiento; λ = tiempo de fase lag, n=3.

Levadura	Máximo crecimiento (células/mL)/10 ⁶	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)
<i>S. cerevisiae</i>	170±41.4	0.5823±0.03	1.3803±0.30
<i>C. lusitaniae</i>	329±19.0	0.5528±0.10	2.2207±0.30
<i>K. marxianus</i>	226±2.56	1.9650±0.96	2.7687±0.54
<i>Z. bailii</i>	258±24.5	1.3246±0.79	3.5627±0.99

Es interesante observar que *S. cerevisiae* presentó el menor crecimiento celular, aunque pareciera ser la cepa mejor adaptada. Por el contrario, *C. lusitaniae* presentó el mayor crecimiento celular, lo que se correlaciona con el alto consumo de azúcares y la baja productividad de etanol en los ensayos que participa. *K. marxianus* y *Z. bailii* presentaron valores de crecimiento similares, la tasa de crecimiento máxima más alta se observó en *K. marxianus*, seguida por *Z. bailii*; por el contrario *S. cerevisiae* y *C. lusitaniae* exhiben tasas de crecimiento máximas de menos de un tercio que las otras cepas. Las cepas con mayor tiempo de adaptación al medio (λ) fueron *K. marxianus* y *Z. bailii* con 2.7687 y 3.5627 h respectivamente. De León et al., 2008², aplicó la metodología de superficie de respuesta para optimizar la fase de fermentación para la producción mezcal a partir de *Agave salmiana*, durante el estudio cinético de fermentación determinaron tasas específicas de crecimiento máximas de 0.6 h⁻¹, resultados similares a los encontrados para *S. cerevisiae* en el presente estudio (0.582 h⁻¹).

7.5.2 Determinación de otros parámetros cinéticos

Tabla 18. Parámetros cinéticos para determinar el comportamiento cinético en el tiempo de fermentación. Td: Tiempo de duplicación; δ : Velocidad de división; μ : Velocidad específica de crecimiento.

Levadura	Td (h)	δ (hr ⁻¹)	μ (hr ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)
<i>S. cerevisiae</i>	3.1271±0.0298	0.3198±0.0030	0.0877±0.0026	0.10	0.46
<i>C. lusitaniae</i>	2.9371±0.0205	0.3405±0.0024	0.1061±0.0022	0.09	0.34
<i>K. marxianus</i>	2.9958±0.0479	0.3339±0.0053	0.1001±0.0048	0.09	0.48
<i>Z. bailii</i>	3.0258±0.0149	0.3305±0.0016	0.0970±0.0014	0.06	0.51

La división celular es una parte importante en el ciclo de vida de la célula, esta división se produce durante el crecimiento. En el presente estudio, el tiempo de duplicación es similar para las cuatro cepas (Tabla 10). En el caso particular de la fermentación por lotes de *S. cerevisiae*, Muñoz y Catrilaf (2013) estimaron un Td = 3.68 h, lo que representa un mayor tiempo de duplicación que en este estudio. Otro parámetro estimado por los mismos autores fue la velocidad específica de crecimiento (μ), ellos reportan un valor de 0.188 h⁻¹. En los resultados obtenidos para el presente estudio, éste parámetro presentó valores más bajos para las cuatro cepas (Tabla 10).

7.6 Análisis estadístico de Diseño Factorial fraccionado 2⁴⁻¹

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de la variable de respuesta (Etanol %v/v) en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Esta tabla nos muestra los efectos que tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica el porcentaje que explica el modelo de la variabilidad en etanol (%v/v).

Tabla 19. Análisis de Varianza para etanol con *S. cerevisiae*. T: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.88445	1	0.88445	1.51	0.3061
B:CA	0.18605	1	0.18605	0.32	0.6119
C:Ph	6.6978	1	6.6978	11.47	0.0429
D:CC	3.8642	1	3.8642	6.62	0.0823
AB+CD	0.0288	1	0.0288	0.05	0.8385
AC+BD	2.95245	1	2.95245	5.06	0.1101
AD+BC	1.67445	1	1.67445	2.87	0.1889
Error total	1.75162	3	0.583873		
Total (corr.)	18.0398	10			

R-cuadrada = 90.2903 %

Tabla 20. Análisis de Varianza para etanol con *C. lusitanae*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.117612	1	0.117612	0.42	0.5617
B:CA	2.91611	1	2.91611	10.49	0.0479
C:pH	0.851512	1	0.851512	3.06	0.1783
D:CC	0.0078125	1	0.0078125	0.03	0.8775
AB+CD	0.800112	1	0.800112	2.88	0.1883
AC+BD	3.60461	1	3.60461	12.97	0.0367
AD+BC	0.0780125	1	0.0780125	0.28	0.6329
Error total	0.833685	3	0.277895		
Total (corr.)	9.20947	10			

R-cuadrada = 90.9475 %

Tabla 21. Análisis de Varianza para etanol con *K. marxianus*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	5.8482	1	5.8482	7.09	0.0761
B:CA	3.8088	1	3.8088	4.62	0.1208
C:pH	0.34445	1	0.34445	0.42	0.5641
D:CC	1.49645	1	1.49645	1.82	0.2706
AB+CD	12.6002	1	12.6002	15.28	0.0297
AC+BD	4.65125	1	4.65125	5.64	0.0980
AD+BC	0.00045	1	0.00045	0.00	0.9828
Error total	2.47329	3	0.82443		
Total (corr.)	31.2231	10			

R-cuadrada = 92.0786 %

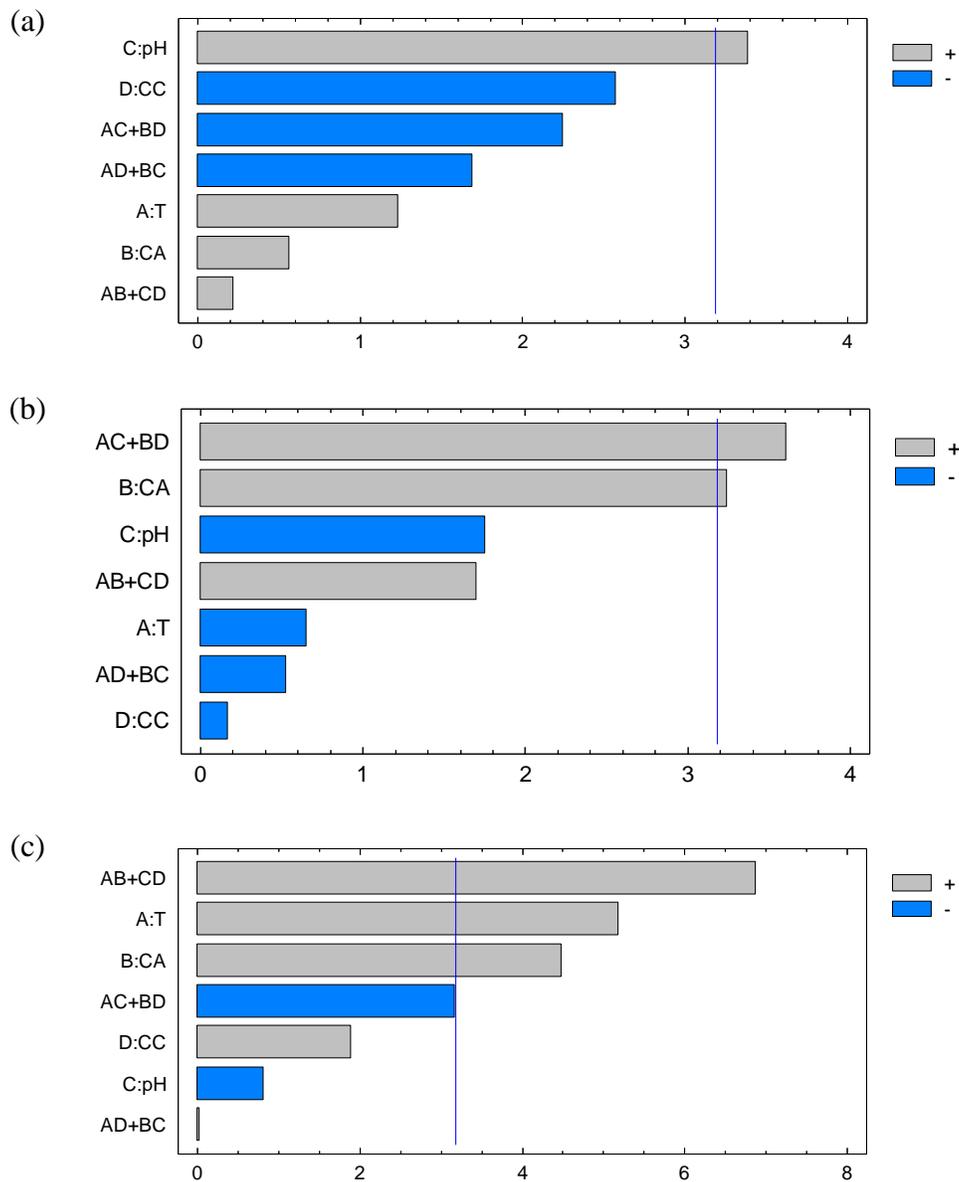
Tabla 22. Análisis de Varianza para etanol con *Z. bailii*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH, D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.127512	1	0.127512	0.05	0.8359
B:CA	0.864612	1	0.864612	0.35	0.5980
C:pH	0.0055125	1	0.0055125	0.00	0.9655
D:CC	2.21551	1	2.21551	0.89	0.4161
AB+CD	0.103512	1	0.103512	0.04	0.8518
AC+BD	0.292613	1	0.292613	0.12	0.7549
AD+BC	0.0136125	1	0.0136125	0.01	0.9458
Error total	7.50597	3	2.50199		
Total (corr.)	11.1289	10			

R-cuadrada = 32.554 %

Los factores con valor-P menor de 0.05 son significativos en el proceso, se muestran marcados en negritas en las tablas. En los análisis de la varianza para la producción de etanol, fue posible eliminar los factores experimentales menos significativos para el proceso y las interacciones que involucraban esos factores; esto sin afectar los ANOVAS, debido a que las interacciones en un diseño fraccionado se encuentran confundidas con otros pares de interacciones de los factores. En el análisis de *S. cerevisiae* el factor menos significativo fue la concentración inicial de azúcares y los más significativos fueron el pH y la concentración de células (Tabla 8). Mientras tanto, para *C. lusitaniae* la concentración inicial de células no

fue significativa, y la concentración de azúcares es el factor más importante para la producción de etanol (Tabla 9). La influencia del pH era despreciable para *K. marxianus*, en contraste, la temperatura y la concentración de inicial de azúcares son factores significativos (Tabla 10). Para *Z. bailii*, la concentración celular exhibe efecto despreciable, y el ANOVA muestra que los otros tres factores no son significativos en este proceso (Tabla 11). Estos resultados se confirmaron mediante los diagramas de Pareto (Figura 8). Los efectos significativos en el proceso son aquellos cuyas barras superan la línea que representa un valor crítico ("t" de Student).



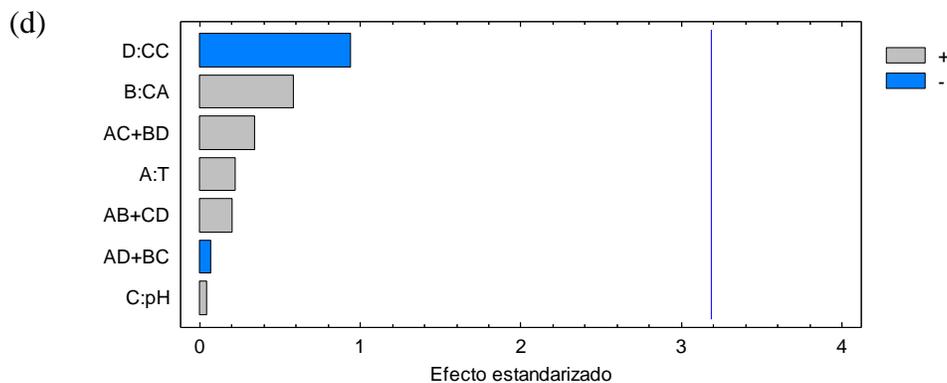


Figura 8. Diagramas de Pareto estandarizados para etanol (%v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitaniae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular.

Se procedió a realizar nuevamente el análisis de los diseños experimentales pero despreciando los factores menos significativos para los sistemas así como las interacciones en las que participaban éstos factores. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 23. Análisis de Varianza para etanol con *S. cerevisiae*. A: Temperatura (T), C: pH, D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.88445	1	0.88445	1.83	0.2480
C:pH	6.6978	1	6.6978	13.83	0.0205
D:CC	3.8642	1	3.8642	7.98	0.0476
AC	2.95245	1	2.95245	6.09	0.0690
AD	1.67445	1	1.67445	3.46	0.1365
CD	0.0288	1	0.0288	0.06	0.8194
Error total	1.93767	4	0.484417		
Total (corr.)	18.0398	10			

R-cuadrada = 89.2589 %

Tabla 24. Análisis de Varianza para etanol con *C. lusitaniae*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.117612	1	0.117612	0.56	0.4962
B:CA	2.91611	1	2.91611	13.86	0.0204
C:pH	0.851512	1	0.851512	4.05	0.1146
AB	0.800112	1	0.800112	3.80	0.1229
AC	3.60461	1	3.60461	17.13	0.0144
BC	0.0780125	1	0.0780125	0.37	0.5754
Error total	0.841498	4	0.210374		
Total (corr.)	9.20947	10			

R-cuadrada = 90.8627 %

Tabla 25. Análisis de Varianza para etanol con *K. marxianus*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), D: Concentración celular (CC).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	5.8482	1	5.8482	8.30	0.0450
B:CA	3.8088	1	3.8088	5.41	0.0807
D:CC	1.49645	1	1.49645	2.12	0.2187
AB	12.6002	1	12.6002	17.89	0.0134
AD	0.00045	1	0.00045	0.00	0.9810
BD	4.65125	1	4.65125	6.60	0.0620
Error total	2.81774	4	0.704435		
Total (corr.)	31.2231	10			

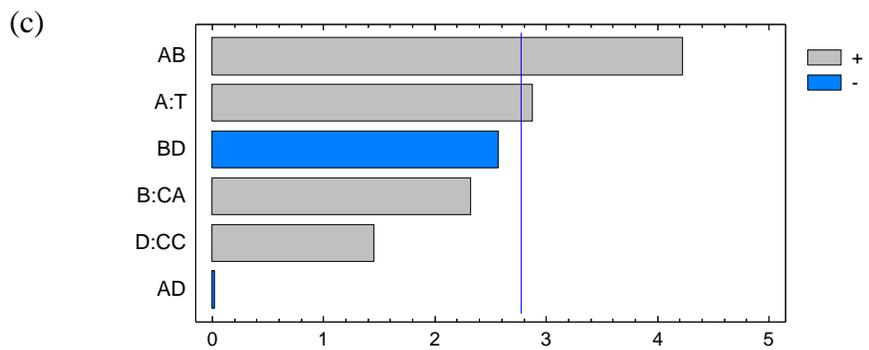
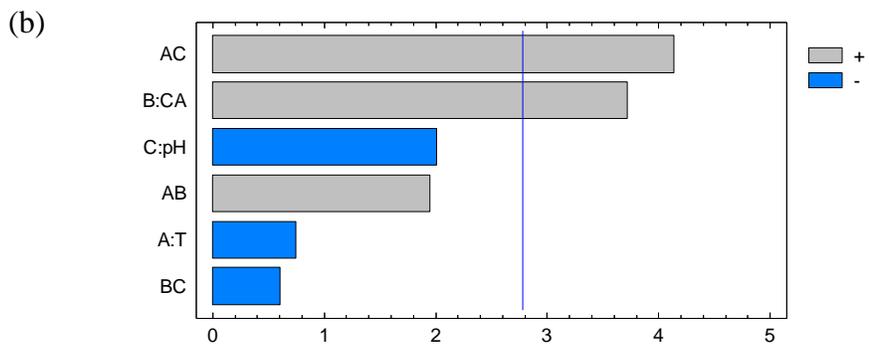
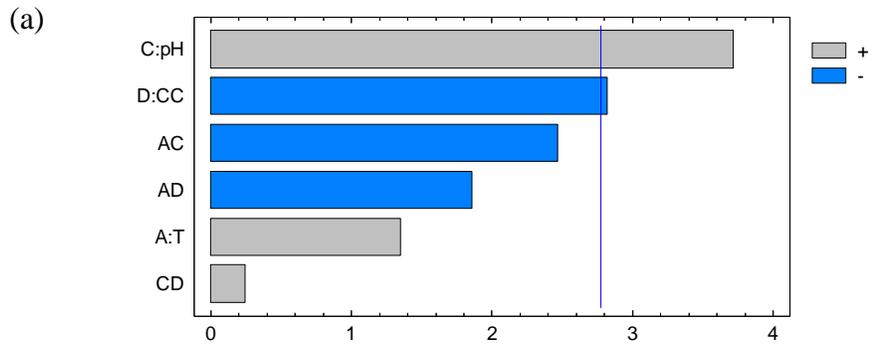
R-cuadrada = 90.9755 %

Tabla 26. Análisis de Varianza para etanol con *Z. bailii*. A: Temperatura (T), B: Concentración de azúcares (CA), C: pH.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:T	0.127512	1	0.127512	0.07	0.8073
B:CA	0.864612	1	0.864612	0.46	0.5347
C:pH	2.21551	1	2.21551	1.18	0.3385
AB	0.103512	1	0.103512	0.06	0.8259
AC	0.0136125	1	0.0136125	0.01	0.9362
BC	0.292613	1	0.292613	0.16	0.7132

Error total	7.51148	4	1.87787
Total (corr.)	11.1289	10	

R-cuadrada = 32.5045 %



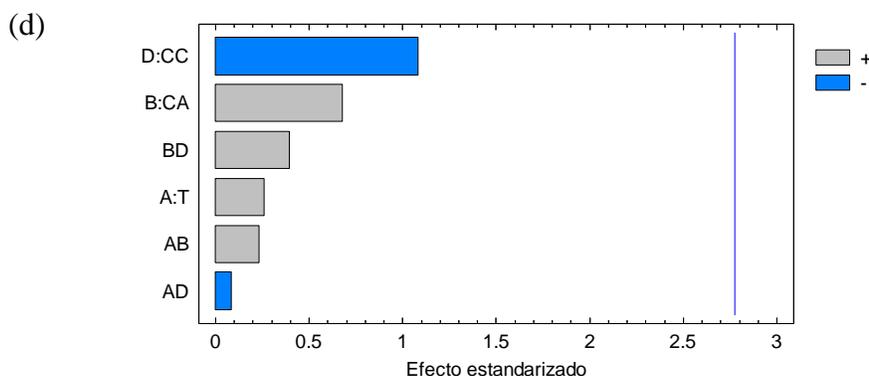
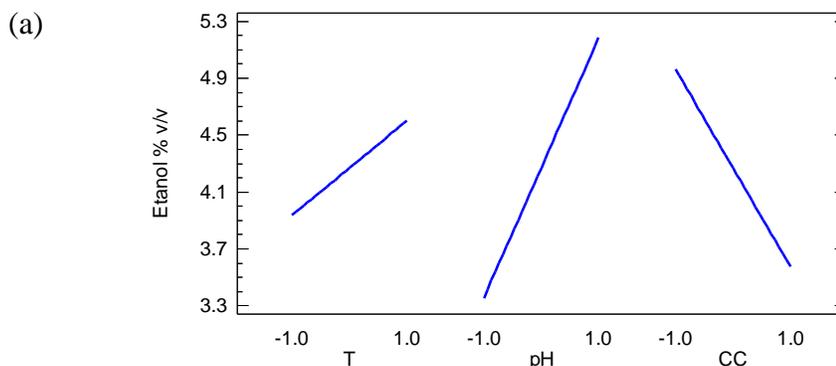


Figura 9. Diagramas de Pareto estandarizados para etanol (%v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitaniae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular.

Al analizar los principales efectos de los cuatro factores estudiados en cada cepa (Figura 9 y 10), fue posible encontrar la combinación de los niveles de cada factor con la mayor producción de etanol (Tabla 9). Las superficies de respuesta (Figura 11) se utilizaron para conocer la región experimental y para detectar la mejor dirección para desplazar la temperatura y la concentración de azúcares iniciales. Con el uso de estas condiciones durante la fermentación con cada cepa individual es posible maximizar las concentraciones de etanol a niveles de aproximadamente 5.99% v/v, 5.25% v/v, 7.33% v/v y 4.92% v/v para *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *K. marxianus* y *Z. bailii*, respectivamente.



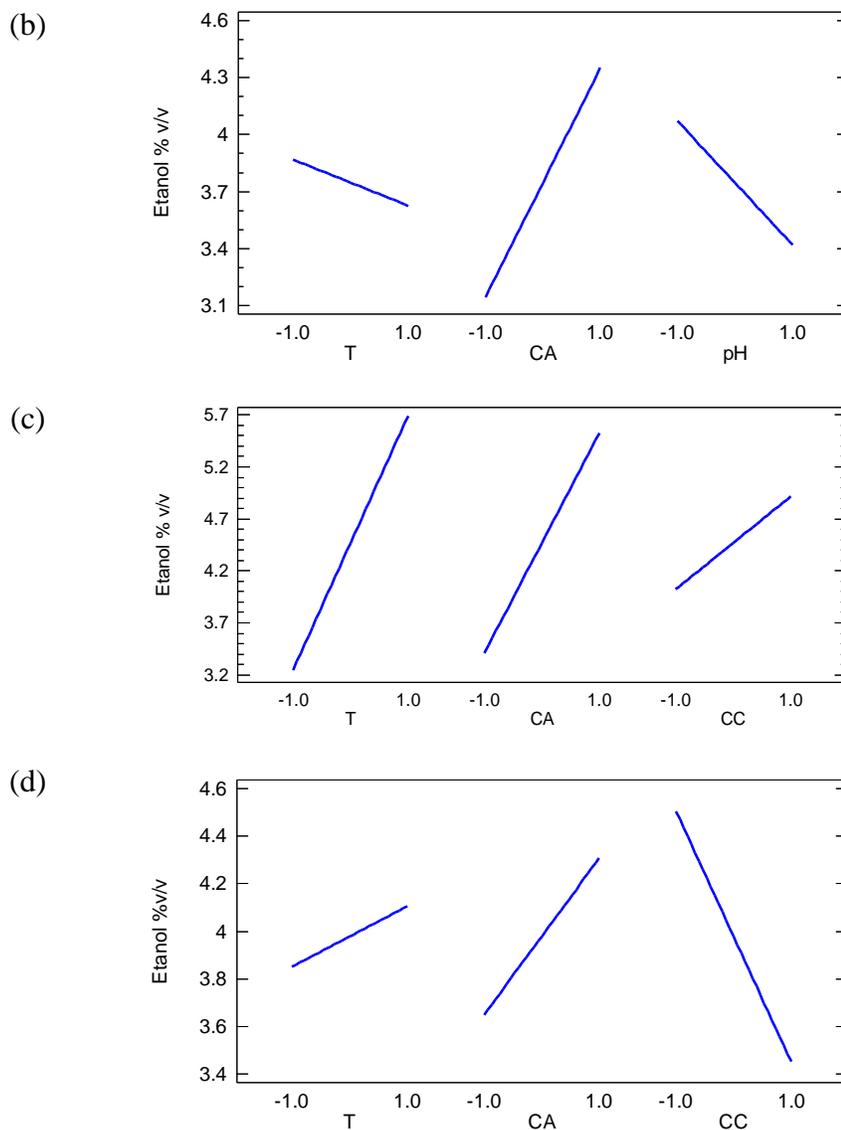
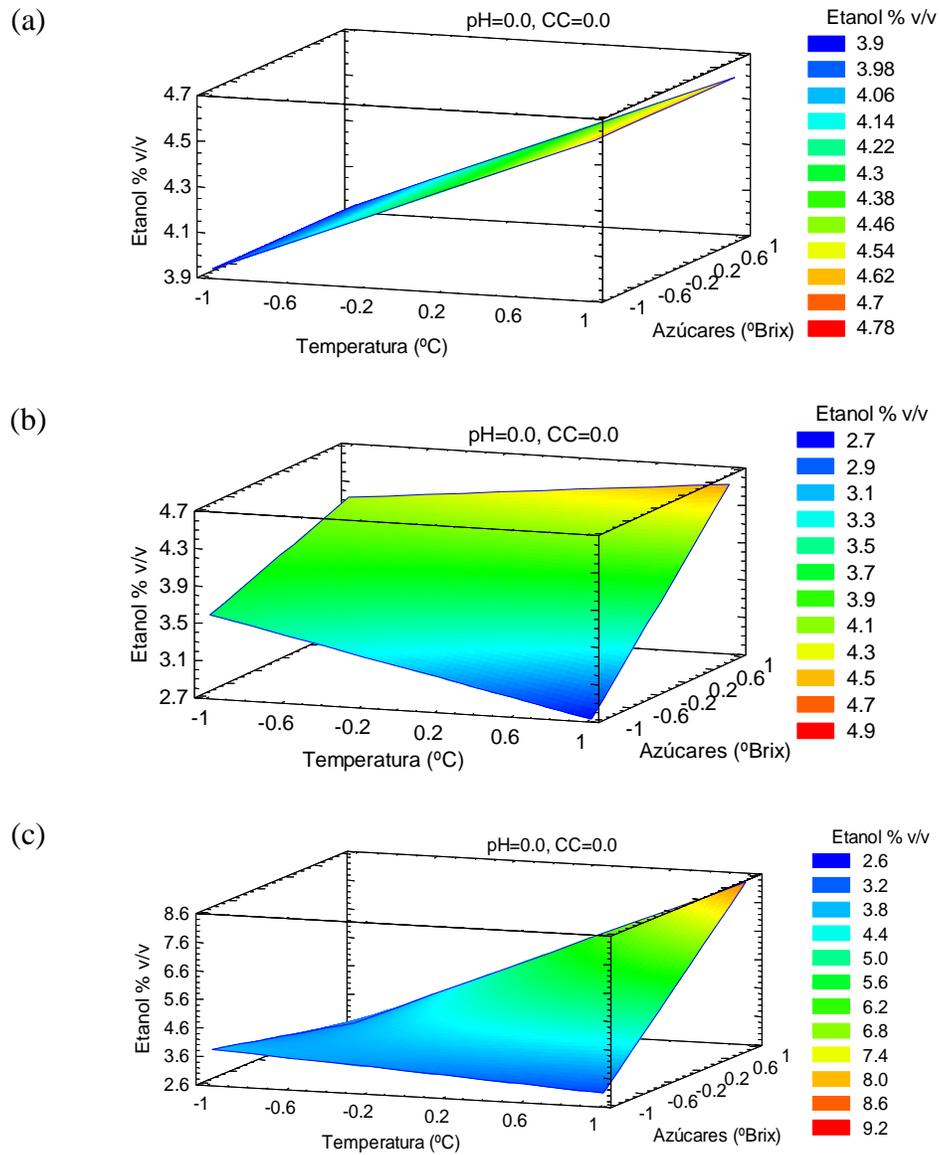


Figura 10. Gráficas de efectos principales para etanol (% v/v). (a) *S. cerevisiae*, (b) *C. lusitaniae*, (c) *K. marxianus*, (d) *Z. bailii*. T: temperatura, CA: concentración de azúcares, CC: concentración celular.

Al analizar los principales efectos de los cuatro factores estudiados en cada cepa (Figura 10 y 11), fue posible encontrar la combinación de los niveles de cada factor con la mayor producción de etanol (Tabla 9). Las superficies de respuesta (Figura 12) se utilizaron para conocer la región experimental y para detectar la mejor dirección para desplazar la temperatura y la concentración de azúcares iniciales. Con el uso de estas condiciones durante la fermentación con cada cepa individual es posible maximizar las concentraciones de etanol

a niveles de aproximadamente 5.99% v/v, 5.25% v/v, 7.33% v/v y 4.92% v/v para *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *K. marxianus* y *Z. bailii*, respectivamente.



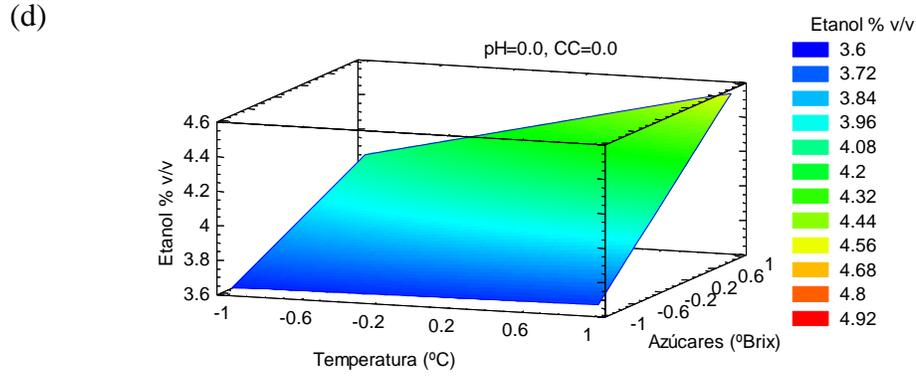


Figura 11. Superficies de respuesta para producción de etanol. (a) *S. cerevisiae* (b) *C. lusitaniae* (c) *K. marxianus* and (d) *Z. bailii*. CC= concentración celular. pH y CC en sus puntos centrales.

Finalmente se calcularon los modelos estadísticos (Ecns. 12, 13, 14 y 15) para la producción de etanol con los factores significativos determinados para cada cepa. Donde Y_S representa la concentración de etanol (% v/v) alcanzada cuando utilizando la cepa “S”, X_1 = temperatura (° C), X_2 = concentración de azúcares iniciales (°Brix), X_3 = pH, X_4 = concentración inicial de células (células/ml/10⁶).

$$Y_{S(S.cerevisiae)} = 4.267 + 0.332X_1 + 0.915X_2 - 0.695X_4 - 0.607X_1X_3 - 0.457X_1X_4 + 0.060X_3X_4 \quad (12)$$

$$Y_{S(C.lusitaniae)} = 3.744 - 0.121X_1 + 0.604X_2 - 0.326X_3 + 0.316X_1X_2 + 0.671X_3X_4 - 0.099X_2X_3 \quad (13)$$

$$Y_{K.marxianus} = 4.199 + 0.855X_1 + 0.69X_2 + 0.432X_4 + 1.255X_1X_2 - 0.0075X_1X_4 - 0.7625X_2X_4 \quad (14)$$

$$Y_{Z.bailii} = 3.976 + 0.126X_1 + 0.328X_2 - 0.526X_4 + 0.114X_1X_2 - 0.041X_1X_4 + 0.191X_2X_4 \quad (15)$$

7.6.1 Maximización de la concentración de etanol

La siguiente tabla muestra las combinaciones de los niveles de cada factor para maximizar la concentración de etanol en las fermentaciones. Bajo éstas condiciones, se lograrían concentraciones aproximadas de 5.99, 5.25, 7.33 y 4.92 (%v/v) para *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *K. marxianus* y *Z. bailii* respectivamente.

Tabla 27. Niveles ideales para una máxima concentración de etanol.

FACTOR	Alto	Bajo	Ideal			
			S. <i>cerevisiae</i>	C. <i>lusitaniae</i>	K. <i>marxianus</i>	Z. <i>bailii</i>
Temperatura (° C)	25	35	35	25	35	35
Concentración de azúcares (° Brix)	10	14	10	14	14	10
pH	4.5	5.5	5.5	4.5	4.5	4.5
Concentración celular inicial (células/mL)/10 ⁶	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0	3.0

7.7 Análisis de los cultivos mixtos

Para realizar el estudio de los consorcios de levaduras, se planteó un diseño de mezclas Simplex-Centroide (Tabla 2), con el fin de determinar cuáles de las cepas en el cultivo o interacciones entre ellas tendrían mayor influencia sobre una o varias de las respuestas de interés. Con los resultados obtenidos de las variables estudiadas se modelaron las respuestas de interés en función de las proporciones de los componentes (cepas) de la mezcla.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los diseños factoriales aplicados a los cultivos puros, se seleccionaron tres cepas (*Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*) en base a su rendimiento de etanol, por ser éste el compuesto mayoritario en una bebida destilada.

El diseño simplex con centroide para $q = 3$ (componentes) incluye las mezclas: $(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0)$; $(0, 1, 0)$; $(0, 0, 1)$; $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0)$; $(\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2})$; $(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$ y $(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3})$. Por lo tanto la matriz de diseños obtenida se muestra a continuación.

Tabla 28. Resumen y base del diseño Simplex-Centroide.

Resumen del diseño	
Clase del diseño	Mezclas
Nombre del diseño	Simplex-Centroide
Tipo de modelo	Cuadrático
Base del diseño	
Número de componentes	3
Número de respuestas	1
Número de corridas	9

Las variables de salida analizadas fueron: crecimiento celular y una vez destilado el mosto, el grado alcohólico (% Alc. Vol.). Se presentan en la tabla siguiente los resultados obtenidos para estas variables.

Tabla 29. Diseño experimental Simplex-Centroide y variables de respuesta.

Test	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>Z. bailii</i>	Etanol % Alc. Vol.	Concentración celular final (células/mL)/10 ⁶
1	0.0	1.0	0.0	43	185
2	0.5	0.5	0.0	41	238
3	0.0	0.0	1.0	32	323
4	0.5	0.0	0.5	12	376
5	1.0	0.0	0.0	10	331
6	0.3	0.3	0.3	24	355
7	0.0	0.5	0.5	27	198
8	0.3	0.3	0.3	29	261
9	0.3	0.3	0.3	30	204

Para obtener el % de Alc. Vol. el mosto de cada ensayo se sometió a destilación, manteniendo constante el volumen de carga (500 ml), la temperatura (85 °C), la agitación (90 rpm) y el tiempo (30 minutos).

La norma establece un intervalo de 35-55 % Alc. Vol. para un destilado apropiado para comercialización, en el caso de los ensayos 4 y 6 el % Alc. Vol. está muy por debajo del valor especificado en la norma, esto puede ser atribuido al tiempo de destilación y la temperatura utilizada ya que se establecieron valores constantes en todos los casos, al modificar estos valores se podría obtener mayor porcentaje alcohólico pero con más bajo rendimiento.

Los valores de concentración celular y concentración de etanol en el mosto se vieron reducidos en el diseño de mezclas, esto puede deberse a que las levaduras se sometieron a un estrés hidrodinámico por efecto de la agitación y aireación en el biorreactor, otro factor que tiene efecto en éstas dos mediciones es la interacción que tiene las cepas en conjunto, por una intolerancia al etanol producido o a otros compuestos volátiles generados, además del rápido agotamiento del sustrato.

7.8 Análisis estadístico de Diseño Simplex-Centroide

7.8.1 Estudio de los modelos

Tabla 30. Efectos estimados del modelo completo para % Alc. Vol.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Media	6833.78	1	6833.78		
Lineal	670.799	2	335.4	5.93	0.0379
Cuadrático	316.238	3	105.413	13.64	0.0297
Cúbico Especial	2.51808	1	2.51808	0.24	0.6704
Error	20.6667	2	10.3333		
Total	7844.0	9			

Tabla 31. Resultados del Modelo Completo.

<i>Modelo</i>	<i>ES</i>	<i>R-Cuadrada</i>	<i>R-Cuadrada ajustada</i>
Lineal	7.52134	66.40	55.20
Cuadrático	2.77997	97.70	93.88
Cúbico Especial	3.21455	97.95	91.82

Estas tablas muestran los resultados de ajustar diferentes modelos a los datos de % Alc. Vol. El modelo medio consiste solamente de la constante. El modelo lineal consiste en términos de primer orden para cada uno de los componentes. El modelo cuadrático agrega productos cruzados entre pares de componentes. El modelo cúbico especial agrega términos que involucran productos de tres componentes. Cada modelo se muestra con un valor-P el cual prueba si ese modelo es estadísticamente significativo. El modelo seleccionado fue el cuadrático por presentar un valor-P menor que 0.05, asumiendo que se trabaja al nivel de confianza del 95.0%.

7.8.2 Análisis de varianza para el modelo cuadrático

La Tabla 7 muestra un análisis de varianza para el modelo cuadrático actualmente seleccionado. Dado que el valor-P para este modelo es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Etanol % Alc. Vol. y los componentes, con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 32. ANOVA para % Alc. Vol.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo Cuadrático	987.034	5	197.407	25.54	0.0116
Error total	23.1879	3	7.72931		
Total (corr.)	1010.22	8			

R-cuadrada = 97.7047 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 93.8791 por ciento
Error estándar del est. = 2.78016
Error absoluto medio = 1.17436
Estadístico Durbin-Watson = 1.19392 (P=0.1241)
Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.22439

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 97.7047% de la variabilidad en Etanol % Alc Vol. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 93.8791%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 2.78016. El error medio absoluto (MAE) de 1.17436 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5.0%.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$Y = 9.820X_1 + 42.820X_2 + 31.8203X_3 + 61.595X_1X_2 - 32.405X_1X_3 - 38.405X_2X_3 \quad (16)$$

Donde Y representa el % de Alc. Vol. alcanzado, $X_1 = S. cerevisiae$, $X_2 = K. marxianus$, $X_3 = Z. bailii$.

7.8.3 Análisis de la metodología de la Superficie de Respuesta.

El análisis de superficie de respuesta (Fig. 13a) así como de los contornos de superficie permitió determinar la mezcla de levaduras más ideal para obtener mayor rendimiento alcohólico. De acuerdo con el gráfico siguiente se observa que para obtener mayores concentraciones de alcohol es necesario desplazarse a la zona naranja-roja que involucra

mezclas entre *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, con % Alc. Vol. de 45 aproximadamente, lo cual se corroboró con el diagrama de contornos (Fig. 13b).

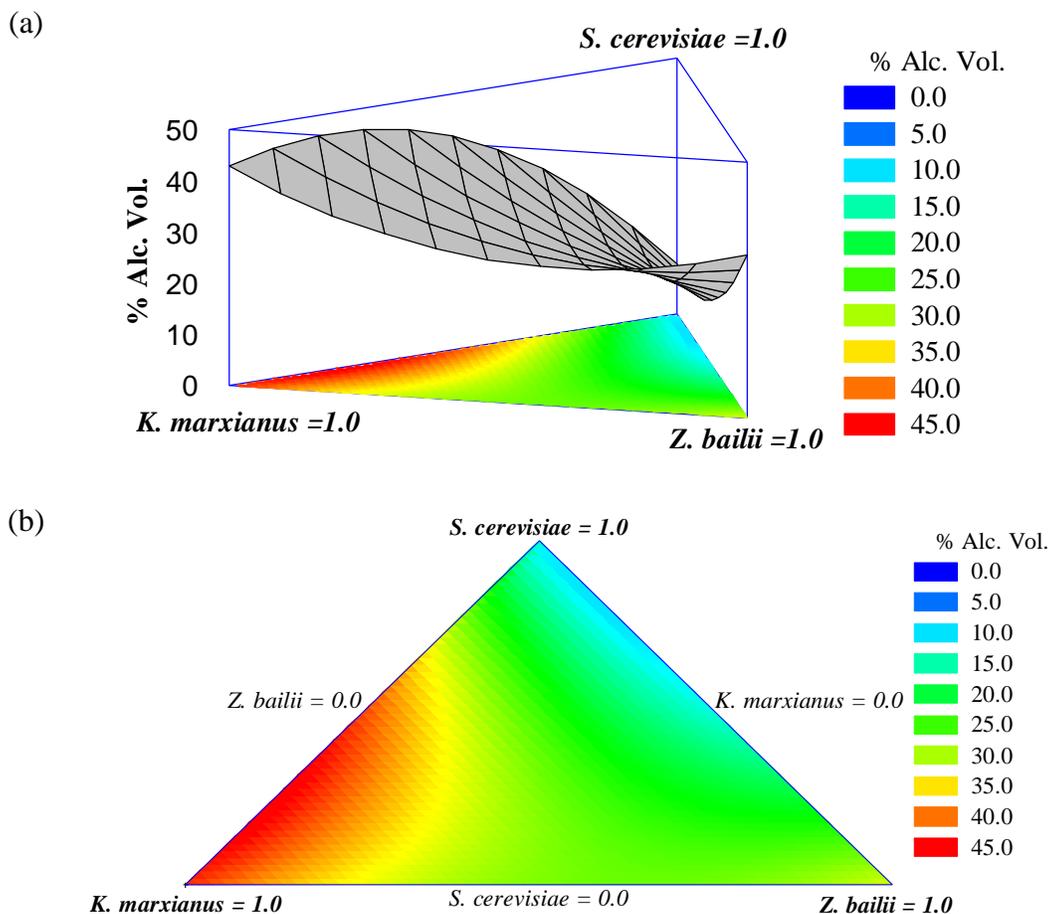


Figura 12. Diagrama de Superficie de Respuesta estimada (a) y de contornos de superficie de respuesta (b) para % Alc. Vol. del consorcio de las tres cepas de estudio.

Otro diagrama útil fue el grafico de traza, el cual permitió evaluar la importancia de los distintos componentes de la mezcla. Esta grafica inicia con una mezcla de referencia (centroide) y muestra la manera en que la respuesta se modifica conforme uno de los componentes aumenta o disminuye su participación en la mezcla. En el siguiente gráfico de traza se observa que el componente con mayor efecto es presentado por *K. marxianus*, ya que cuando este se modifica se logran los mayores cambios en *Y*.

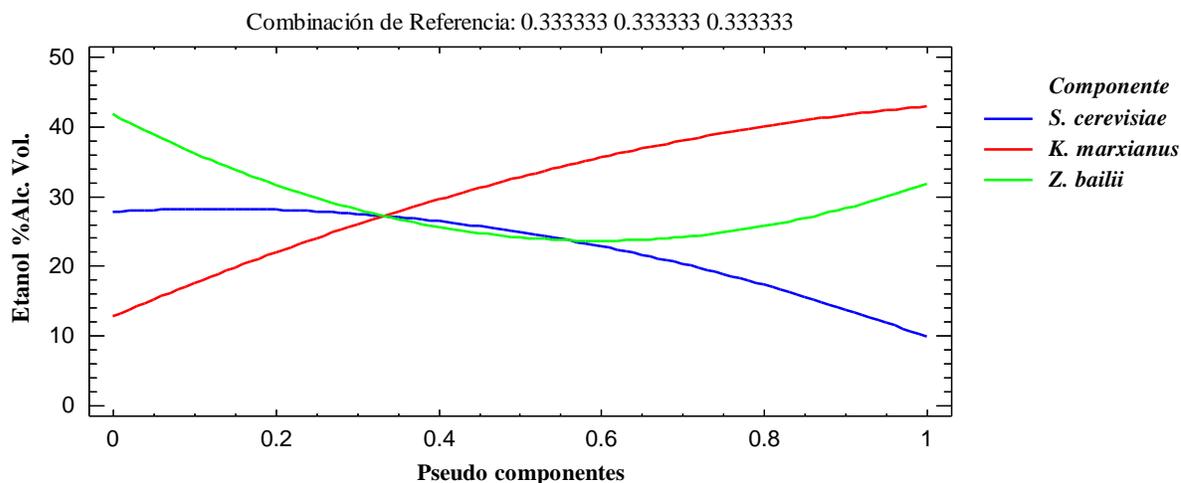


Figura 13. Gráfico de traza para % Alc. Vol. del consorcio de las tres cepas de estudio.

7.9 Análisis químico

Una vez calculados los parámetros cinéticos de cada fermentación de cultivos mixtos, se procedió a realizar la destilación y rectificación de los mostos fermentados para finalmente realizar su análisis químico.

En primer lugar se determinó el extracto seco y la acidez total para cada uno de los ensayos del diseño de mezclas.

Tabla 33. Análisis químico de los destilados, NOM-006-SCFI-2005. *mg/100 mL AA: miligramos en 100 ml de alcohol anhidro.

Ensayo	Extracto seco (g/L)	Acidez total (mg/100 mL AA)*
1	0.050±0.014	22.344±0
2	0.050±0.014	17.576±12.43
3	0.060±0	39.408±2.65
4	0.040±0.057	110.092±14.15
5	0.010±0.014	138.115±25.48
6	0.010±0.042	75.601±10.67
7	0.010±0.014	97.827±16.06
8	0.030±0.041	30.607±1.93
9	0.010±0.014	69.528±2.081

En cuanto a extracto seco, los valores encontrados cumplen con las especificaciones de ambas normas (mezcal: 0.2-10 g/l; tequila: 0-0.3 g/l). Se observa que en la especificación para el mezcal el mínimo permitido es de 0.2 g/l por lo que los valores encontrados en los ensayos son inferiores a éste, sin embargo la norma reguladora del mezcal (NOM-070-SCFI-1994) es menos estricta por ser elaborada en su mayoría para productores artesanales, comparada con la norma reguladora del tequila que utiliza procesos más tecnificados.

Para acidez total en mg/100 ml referidos a alcohol anhidro, la norma reguladora del mezcal especifica un máximo permitido de 170 mg/100 ml AA, por lo que los valores encontrados en cada ensayo se encuentran por debajo de este valor, permitiendo que el destilado sea propio para consumo. La norma del tequila no tiene regulado el parámetro de acidez total.

7.9.1 Cuantificación metanol y alcoholes superiores. (NMX-V-005-NORMEX-2005)

Para esta determinación se realizó el análisis de los estándares puros, muestras puras y muestras más estándar interno. Éste último debió aparecer en un sitio del cromatograma, libre de traslapes y desde luego no debió ser componente de la muestra, pero sí de la misma naturaleza química y del mismo intervalo de concentración que el componente de la muestra por cuantificar.

En este caso se utilizó el n-butanol como estándar interno, a una concentración constante de 10 mg/100 ml para las muestras y las diluciones de calibración. Se presenta en la figura siguiente los cromatogramas obtenidos de una de las muestras con y sin estándar interno.

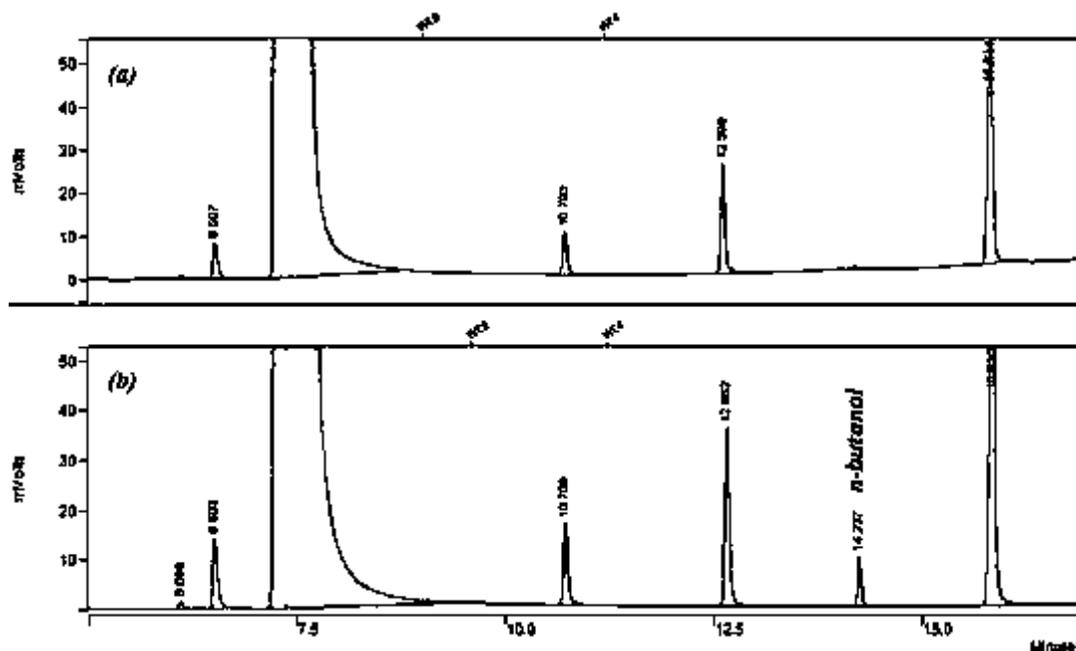


Figura 14. Cromatograma ensayo 2 (mezcla: *S. cerevisiae*+*K. marxianus*). (a) Sin estándar interno, (b) Con estándar interno.

El n-butanol presentó un tiempo de retención de 14.2 ± 0.0403 , lo cual fue corroborado con el cromatograma del estándar puro. El área del pico del n-butanol se mantuvo constante para todos los ensayos (Fig. 16).

Para realizar el cálculo de la concentración de cada componente se identificó cada uno de los estándares mediante su inyección pura. Posterior a esto se realizó la inyección de la muestra más el estándar interno y de las diluciones de calibración más el estándar interno.

Tabla 34. Tiempos de retención de los estándares puros.

Estándares puros	Tiempo de retención (min)
Acetaldehído	3.772 ± 0.004
Metanol	6.5225 ± 0.027
S-butanol	10.227 ± 0.014
1-propanol	11.282 ± 0.0721
1-butanol	14.202 ± 0.0361
Iso-butanol	12.653 ± 0.033
Iso-amílico	15.859 ± 0.0105
Acetato de etilo	6.103 ± 0.016
Etanol	7.735 ± 0.0467

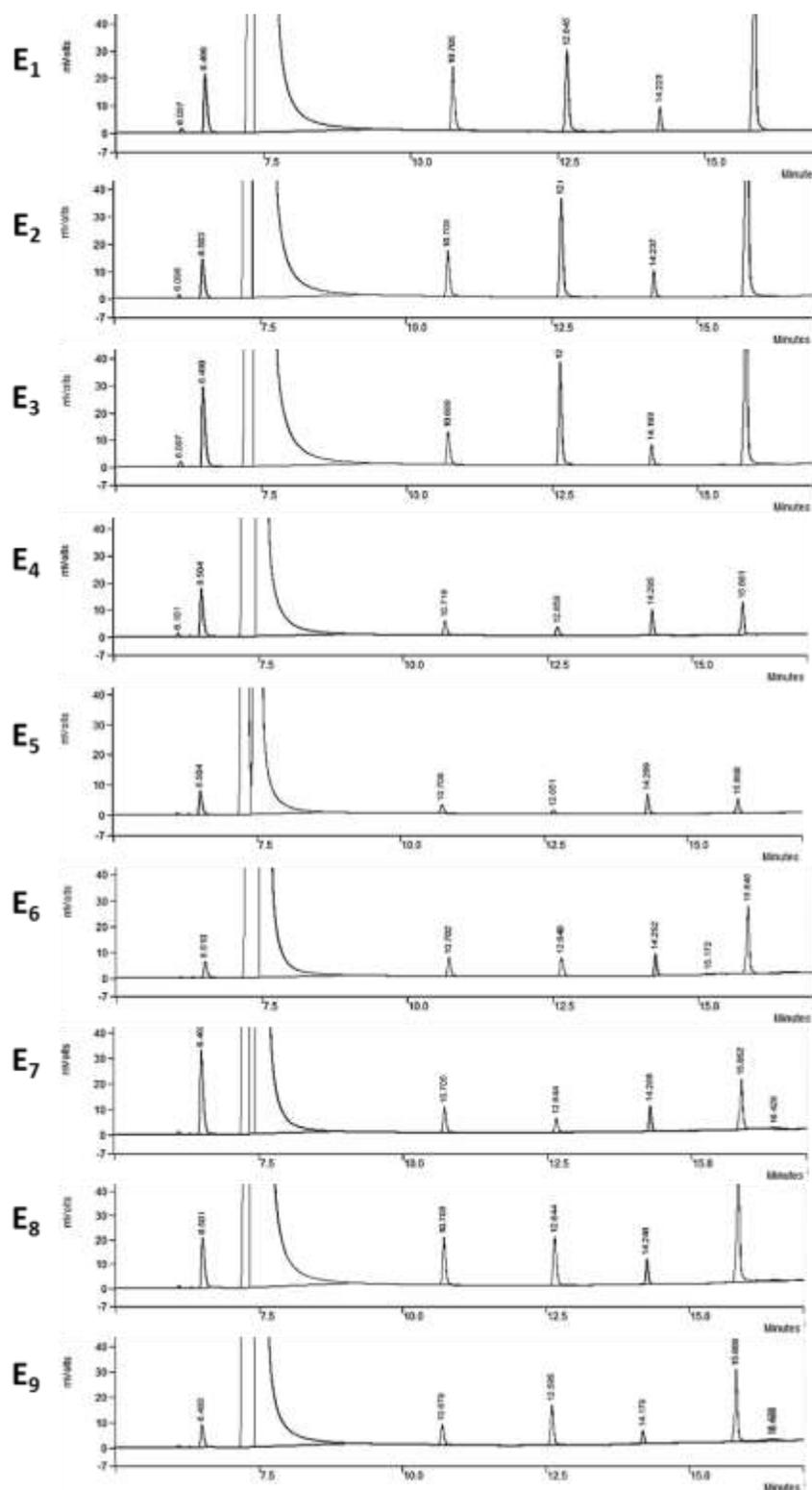


Figura 15. Cromatogramas de muestras destiladas más estándar interno en los 9 ensayos del diseño experimental.

Se calculó la relación del área correspondiente al componente “i” (A_{ib}) y la solución de estándar interno (A_e) en cada cromatograma, dividiendo el área del componente “i” entre el área del estándar interno (A_e). Se calculó la relación de concentración correspondiente al componente “i” (C_{ib}) y al estándar interno (C_e) en cada cromatograma dividiendo la concentración del componente “i” entre la concentración del estándar interno (C_e). Con estos valores obtenidos se trazó la curva de relación de áreas contra la relación de concentraciones, considerándola válida con un coeficiente de determinación mayor o igual a 0.99. Todas las inyecciones se realizaron por duplicado.

Con el valor de C_{ib}/C_e obtenido para la muestra en la curva de calibración y conociendo la cantidad de patrón interno (C_e) agregado a la solución de muestra estandarizada se calculó la concentración del componente “i” en la muestra (C_{im}) con la siguiente fórmula:

$$C_{im} = C_e \times R_g \quad (17)$$

Y finalmente para obtener el componente “i” expresado en mg/100 ml de alcohol anhidro como lo establece la norma, se utilizó la siguiente expresión:

$$B = \frac{C_{im} \times F_d \times 100}{\% Alc. Vol.} \quad (18)$$

Se presentan en la tabla siguiente las curvas de calibración para cada compuesto identificado. Se aplicó el mismo procedimiento para cada uno de los compuestos identificados y las muestras destiladas.

Tabla 35. Curvas de calibración por estandarización interna para cada componente y su coeficiente de determinación.

Compuesto	Curvas de calibración
Acetaldehído	$y = 0.398x + 0.0594; R^2 = 0.975$
Metanol	$y = 0.3571x + 0.0951; R^2 = 0.9949$

2-butanol	$y = 0.433x + 0.3039; R^2 = 0.9948$
1-propanol	$y = 0.7635x + 0.0937; R^2 = 0.9944$
Iso-butanol	$y = 1.173x - 0.3019; R^2 = 0.9826$
Iso-amílico	$y = 0.8398x + 0.4364; R^2 = 0.9937$
Acetato de etilo	$y = 0.275x + 0.1455; R^2 = 0.9721$
Etanol	$y = 3 \times 10^6 x + 687103; R^2 = 0.9967$

Tabla 36. Concentraciones de compuestos volátiles de los ensayos del diseño de mezclas (mg/100 ml of alcohol anhidro).

Test	Acetaldehído	Metanol	S-Butanol	1-Propanol	Iso-Butanol	Iso-Amílico	Acetato de Etilo
1	NC	216.24±2.3	NC	103.95±1.53	95.30±1.36	270.67±8.54	2.89±2.29
2	NC	102.99±42.9	NC	56.01±22.01	93.77±29.73	441.51±13.60	NC
3	NC	484.047±28.8	NC	89.31±4.67	183.15±4.27	489.63±41.05	16.36±0.54
4	NC	520.75±62.7	NC	66.33±11.51	53.96±4.06	121.69±35.86	NC
5	NC	410.36±25.6	NC	118.00±61.79	61.39±13.92	49.73±4.39	2.98±27.04
6	NC	125.32±18.1	NC	39.39±28.52	61.64±4.55	260.95±24.04	NC
7	NC	491.38±27.4	NC	66.78±4.60	38.62±0.38	98.71±9.72	NC
8	NC	273.09±8.8	NC	107.74±9.81	86.32±15.30	320.61±1.11	NC
9	NC	235.08±13.9	NC	139.48±63.44	186.53±73.80	314.75±29.05	4.61±8.57

Aldehídos (como acetaldehído): 0-40; Metanol: 3-300; Alcoholes superiores (como S-Butanol, 1-propanol y Iso-amílico): 20-500; Ésteres (como acetato de etilo): 2-200. Valores expresados en mg/100 ml de Alcohol Anhidro. NC: Compuesto no cuantificable por el equipo debido a su baja presencia (NOM-006-SCFI-2005, NOM-070-SCFI-1994).

En la Tabla 36 se presenta un resumen de los porcentajes promedio de áreas por compuesto químico encontrado. En la figura 16 se presentan éstos mismos porcentajes así como su distribución en cada uno de los ensayos analizados. Se puede observar que en todos los ensayos el metanol, propanol, Iso-butanol y Iso-amílico, son los compuestos más abundantes, contrario al acetato de etilo que se encuentra en muy pequeña concentración. Tanto el acetaldehído como el S-butanol fueron identificados en los cromatogramas pero no fue posible la cuantificación debido a su baja área cromatográfica. En este caso se requiere de una concentración mayor para cuantificarlos.

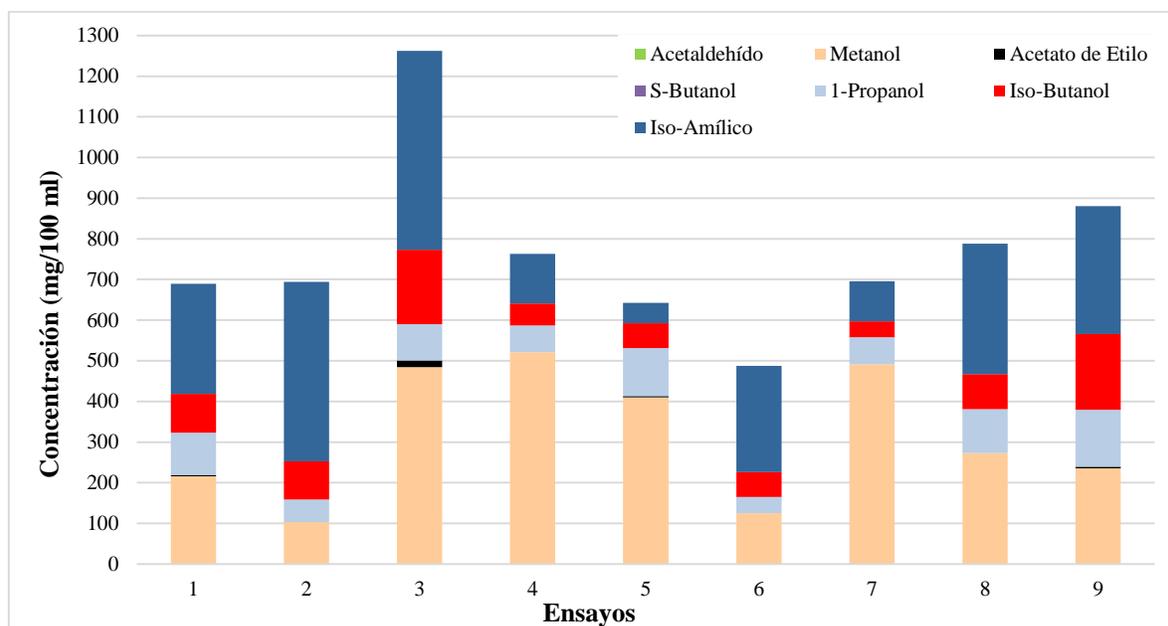


Figura 16. Gráfica de columnas apiladas de compuestos volátiles para cada ensayo.

Tabla 37. Porcentaje de área cromatográfica por compuesto. tr: tiempo de retención.

Compuesto	tr	Ensayos (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acetaldehídos	3.77	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol	6.52	0.1586	0.0879	0.2041	0.1759	0.1796	0.0927	0.3257	0.1387	0.0954
Acetato de Etilo	6.1	0.0101	0.0067	0.0111	0.009	0.012	0	0.007	0.004	0.005
S-Butanol	10.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n-Propanol	10.74	0.1703	0.1001	0.0832	0.0545	0.0734	0.1007	0.0986	0.1222	0.086
Iso-Butanol	12.65	0.2223	0.2227	0.2437	0.0336	0.0316	0.287	0.064	0.1384	0.1673
Iso-Amílico	15.86	0.512	0.6563	0.4855	0.0997	0.0995	0.4644	0.178	0.3823	0.2987
Etanol	7.66	93.7345	92.3461	91.8241	56.5219	77.8987	82.027	78.1227	92.1506	73.039

En resumen la composición del mezcal y su variabilidad es compleja y cada componente requiere de estudios adicionales para elucidar su origen y sus efectos en el cumplimiento de las normas y en las características sensoriales en el producto final. Para lograrlo es indispensable estandarizar los procesos de producción para lograr con ello la obtención de productos de calidad uniforme y constante.

8. CONCLUSIÓN

Mediante el presente estudio, se realizó el simulado de las curvas de crecimiento y de consumo de sustrato durante el proceso de fermentación con levaduras silvestres aisladas y caracterizadas, lo cual posibilitó la optimización de las condiciones de cultivo y el establecimiento de un proceso más estandarizado que permitirá conducir procesos que mejoren las características y los rendimientos finales del producto destilado. Al considerar este aspecto, uno de los objetivos de este trabajo fue obtener los parámetros cinéticos durante el cultivo de las cepas *K. marxianus*, *Z. bailii* y *C. lusitania* y *S. cerevisiae* a escala matraz y posteriormente se evaluó su comportamiento en consorcio a escala biorreactor.

Los primeros resultados obtenidos permitieron seleccionar 3 de las 4 cepas para conducir las a los diseños de mezclas, esto de acuerdo con la producción de etanol y el crecimiento celular obtenido, además de establecer las condiciones del cultivo para las fermentaciones mixtas en el biorreactor. Por lo cual, las cepas seleccionadas fueron: *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *Z. bailii* y las condiciones ideales para conducir la fermentación: 32.5 °C, 14 °Brix, pH = 5.5, 150 rpm y 1 vvm. Se observó que la cepa *K. marxianus* presentó la mayor producción de etanol siendo este de aproximadamente 7% v/v, mientras que *C. lusitaniae* presentó el mayor crecimiento celular, siendo de 342.79×10^6 cél/mL. De acuerdo con los gráficos de superficie de respuesta obtenidos, se observó que para obtener mayor grado alcohólico es recomendable utilizar mezclas de cultivo que involucren a *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, obteniéndose destilados con un porcentaje de alcohol en volumen de 41 aproximadamente. Con el modelo seleccionado para cultivos mixtos, se determinó en que porcentaje debe participar cada uno de los componentes (cepas de levadura) para lograr que la formulación del consorcio tenga las propiedades deseadas.

Mediante el análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases se identificaron los componentes especificados en las normas oficiales en los destilados obtenidos para cada ensayo del diseño de mezclas. Éstos compuestos han sido reportados como odorantes importantes en otras bebidas alcohólicas como el tequila. Los compuestos con mayor presencia en los destilados fueron el metanol y etanol y los alcoholes superiores como el propanol, Iso-butanol y Iso-amílico. En la mayoría de los ensayos, los compuestos identificados y cuantificados se encontraron dentro de las especificaciones de las normas reguladoras.

9. REFERENCIAS

- Aguirre D., Eguiarte L. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of Wilde *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*. 90: 36-44.
- Arrhenius P., McCloskey P., Sylvan M. 1996. Chemical Markers for aroma of *Vitis vinifera* Var. Chardonnay Regional Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (4): 1085–1090.
- 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. *Canadian Journal of Microbiology*. 48 (11): 965-970.
- Arrizon J., Gschaedler A. 2006. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*. 102 (4): 1123-1131.
- Baccou, J. C., Lambert F., Sauvaire Y. 1977. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *The Analyst*. 102: 448-465.
- Bahre J., Bradbury E. 1980. Manufacture of mezcal in Sonora, Mexico. *Economic Botany*. 34: 391-400.
- Benn M., Peppard L. 1996. Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (2): 557–566.
- Botello J., Cárdenas M., Estrada A., Molina J., Jiménez H., Navarrete J., Rico R. 2007. Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6 (1): 41-50.
- Botello J., García M., Jiménez H., Navarrete J., Rico R., Miranda R. 2011. Kinetic study of the thermal hydrolysis of *Agave salmiana* for mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (13): 7333–7340.
- Burwell T. 1995. Bootlegging on a desert mountain: the political ecology of *Agave* (*Agave spp.*) demographic change in the Sonora River Valley, Sonora, Mexico. *Human Ecology*. 23: 407–432.
- Carbó R., Ginovart M., Vias M. 2008. Influencia de *Brettanomyces/Dekkera* en la evolución de la fermentación alcohólica. Presentación. 5-7 de noviembre. Barcelona, España: *II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria, V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*
- Carrau M., Medina K., Boido E., Fariña L., Gaggero C., Dellacassa E., Versini B., Henschke P. 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiology Letters*. 243 (1): 107-115.
- Cedeño M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15: 1-11.
- Cervantes, M. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México: UNAM, Instituto de Geografía. [Versión electrónica]. Recuperado de: URL (<https://books.google.com.mx>), pp. 63-66, 73.

- Cházaro M., Valencia O., Hernández M. 2007. Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. Agaves del Occidente de México. Guadalajara, México: CUCBA-CUCSH, [Versión electrónica], p 123-126.
- Choteborská P., Palmarola B., Galbe M., Zacchi G., Melzoch K., Rychtera, M. 2004. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*. 61 (4): 561–565.
- Cole C., Noble, C. 2003. Flavor chemistry. In: Fermented Beverage Production. New York, United States: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p 393-396.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez, J. 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. In: Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué, A., Eguiarte, L.E. and Zizumbo-Villarreal, D. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. México: CICY, CONACYT, CONABIO, INE, p 229-248.
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). 2015. Informe de actividades, 2015.
- Conabio. 2006. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México, D.F.: Redacta, S.A. de C.V, p 5-70.
- Cuello C., Juárez B., Aguirre J., Pinos J. 2008. Quantitative characterization of non-structural carbohydrates of mezcal Agave (*Agave salmiana Otto ex. Salm-Dick*). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 56 (14): 5753-5760.
- Damián R, González J, Chávez M. C. 2012. Aislamiento, caracterización molecular y bioquímica del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica para la producción de mezcal en Michoacán. BSc Thesis, Michoacán, México.
- De León A., Escalante P., Jiménez M., Ordoñez L., Flores J., Barba A. 2008¹. Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology*. 46 (4): 448-455.
- De León A., Escalante P., Barba de la Rosa A., Blaschek H. 2008². Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 47 (1): 76-82.
- Delgado-Lemus A., Casas A., Téllez O. 2014. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 10: 63.
- Díaz D., Marie D., Estarrón M., Strehaiano P. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *International peer-reviewed journal Enzyme and Microbial Technology*. 42 (7): 608-616.
- Díaz D., Córdova J., Valle J. 2011. Efecto interactivo de las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en la fermentación de jugo de agave con *Kloeckera africana*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco Guerrero, México.

- Díaz D., Valle J., Córdova J., Estarrón M., Hernández G. 2012. Fermentation of *Agave tequilana* juice by *Kloeckera africana*: influence of amino-acid supplementations. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 101 (2): 195-204.
- Escalante P., Ibarra V., Rosu H., De León A., González R. 2009. Online monitoring of mezcal fermentation based on redox potential measurements. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 32 (1): 47-52.
- Esteve B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International journal of systematic bacteriology*. 49 (1): 329-37.
- Ferreira V., Ortian N., Escudero A., Loopez R., Cacho J. 2002. Chemical characterization of the aroma of grenade rose wines. Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (14): 4048-4054.
- Fleet H., Lafon S., Ribéreau P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied Environ Microbiology*. 48:1034-1038.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M. 1993. Yeast growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed. G.H. Fleet) pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- García-Mendoza A. 2007. Los agaves de México. *Ciencias, Universidad Autónoma de México*. 087: 14-23.
- García-Mendoza A., Ordoñez M., Briones, M. 2004. *Agaváceas*. Biodiversidad de Oaxaca, p 159-169.
- Gallardo J., Gschaedler C., Cházaro M., Tapia E., Villanueva S., Salado J. H., Villegas E., Medina R., Aguirre M., Vallejo M. 2008. La producción de mezcal en el estado de Michoacán. Gobierno del Estado de Michoacán y Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco. Michoacán, México, p 90-96.
- Gentry H. 1982. *Agaves of Continental North America*. Arizona, Estados Unidos: University of Arizona Press, p 25-47, 670.
- González J. C., Damián R. M., Pérez E., Chávez, M. C. 2012. Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11 (3): 389-400.
- Gschaedler A., Verdugo A., Segura L., Kirchmayr M., Ramírez P., González A., Coria R. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 100 (4): 497-506.
- Heard M., Fleet H. 1986. Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food technology in Australia*. 38: 22-25.
- Illsley C., Tlacotempa A., Rivera G., Morales P., Garcia J., Casarrubias L., Calzada M., Calzada R., Carranca C., Flores J., Omar E. 2005. Maguey papalote: para todo mal, mezcal; para todo bien, también. La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. SEMARNAT, México.

- Jiménez-Valdés M., Godínez-Alvarez, H., Caballero J. 2010. Population Dynamics of *Agave marmorata* Roehl. under two Contrasting Management Systems in Central Mexico. *Econ Bot.* 64: 149
- Kunkee E., Amerine M. 1970. Yeasts in winemaking. In: *The Yeasts Technology*. Academic Press, London: A.H. Rose and J.S. Harrison, p. 5-72.
- Kunkee E. 1984. Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*. 1 (4): 315-332.
- Lafon S. 1983. Wine and brandy. In *Biotechnology*. Weinheim, Verlag, Chemie: H.H. Rehm y G. Reed, p 81-163.
- Lachance M. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 68: 151-160.
- Lachenmeier W., Sohnius M., López G. 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican Agave spirits (tequila, mezcal, sotol and bacanora). *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 54 (11): 3911-3915.
- Lappe R. Moreno R., Arrizón J., Herrera T., García A., Gschaedler A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*. 8 (7): 1037-1052.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.
- López M. C. 1999. Tequila Aroma. In: *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. New York, United States: Edited by Shahidi, and Kluwer Academic, p 211-217.
- López M., Guevara, Y. 2001. Authenticity of three mexican alcoholic beverages by SPME-GCMS. New Orleans, L. A: Annual Meeting of Institute of Food Technologists, p 10-3.
- López A., Díaz P., Campos, G. 2012. Estudio comparativo de rendimiento y contenido de compuestos volátiles en un proceso de elaboración de Tequila a nivel industrial. *Ciencia Nicolaita*. 57: 41-52.
- Mancilla N., López M. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (4): 806–812.
- Martin M., Peters C., Palmer M., Illsley C. 2011. Effect of habitat and grazing on the regeneration of wild *Agave cupreata* in Guerrero, Mexico. *Forest Ecology and Management*. 262:1443-1451.
- Modig T., Liden G., Taherzadeh J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 363: 769-776.
- Nattorp A., Graf M., Spuhler C., Renken, A. 1999. Model for Random Hydrolysis and End Degradation of Linear Polysaccharides: Application to the Thermal Treatment of Mannan in Solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 38: 2919-2926.

- NOM-070-SCFI-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana: Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- NOM-006-SCFI-2005. 2005. Norma Oficial Mexicana: Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- Nobel. 1998. Los incomparables agaves y cactus. México, 1ª ed., Trillas, p. 166.
- Palmqvist E., Hahn, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74 (1): 25–33.
- Palmqvist E., Almeida S., Hahn B. 1999. Influence of Furfural on Anaerobic Glycolytic Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 62 (4): 447–454.
- Pérez E., González J. C., Chávez M. C., Cortés C. 2013. Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12 (3): 451-461.
- Pinal L., Cornejo E., Arellano M., Herrera E., Nuñez L., Arrizon J., Gschaedler, A. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology*. 36 (5): 655-661.
- Querol A., Jiménez M., Huerta T. 1990. A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*. 55 (6): 1603–1606.
- Ramírez O, Molina M. 2005. Evaluación de parámetros cinéticos para *Sacharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. *Ingeniería*. 15 (2):91-102.
- Ribéreau J., Peynaud E., Ribéreau P., Sudraud P. 1975. Sciences et Techniques du Vin. Tome II. Dunod, Paris.
- Ribéreau P. 1985. New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36 (1): 1-10.
- Santiago P., López M., Vera A. M. 2009. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32 (4): 273-279.
- Sárvári I., Franzén C., Taherzadeh M., Kiklasson C., Lidén, G. 2003. Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (7): 4076-4086.
- Secretaría de Economía. NOM-006-SCFI-2005. 2006. Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaria de Salud. NOM-142-SSA1-1995. 1996. Norma Oficial Mexicana: Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. Diario Oficial de la Federación.

- Schütz, M. y Gafner, J. (1994) .Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 253-257.
- Torres I., Blancas J., León A., Casas A. 2015. TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of *Agave inaequidens* in Michoacán, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 11(1): 1.
- Valenzuela A. 1997. El agave tequilero, su cultivo e industria. México: 2ª ed., Monsanto-Litteris, p 204.
- Valle J.O., Córdova A., Estarrón M., Hernández G., Díaz D. M. 2009. Effect of the amino-acids supplementation on the *Agave tequilana* juice fermentation by *kloeckera africana* in batch and continuous cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*
- Vallejo C., González C. 2000. Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas Mexicanas.* 8, 1-17.
- Vallejo B., González A., Estrada M. 2004. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase micro-extraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52 (18): 5567-5571.
- Waleckx E., Gschaedler A., Colonna B., Monsan P. 2008. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry.* 108 (1): 40-48.
- Waleckx E, Mateos J., Gschaedler A. 2011. Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery. *Food Chemistry.* 124 (4): 1533–1542.
- Waterhouse L., Towey P. 1994. Oak Lactone Isomer Ratio Distinguishes between Wines Fermented in American and French Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 42 (9): 1971-1974.
- Zambonelli C. 1988. Microbiologia e Biotecnologia dei Vini. Edagricole. Bologna, Italy.
- Zamora P., Juárez F., Aguirre R., Ortiz P., Godínez H., Álvarez F. 2010. Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero Potosino. *Revista Digital Científica y Tecnológica, e-Gnosis.* 8: 1-11.
- Zizumbo-Villareal, D., González, F., Olay, A., Platas, R., Cuevas, M., Almendros, M., Colunga-GarcíaMarín, P. 2009¹. Archaeological Evidence of the Cultural Importance of Agave spp. in Pre-Hispanic Colima, Mexico. *Economic Botany*, 63(3), 288-302.
- Zizumbo-Villareal D., González F., Olay A., Almendros L., Flores P., Colunga-GarcíaMarín P. 2009². Distillation in Western Mesoamerica before European Contact. *Economic Botany.* 63(4): 413-426
- Zizumbo-Villareal D., Vargas O., Rosales J. J., Colunga-GarcíaMarín P. 2012. Sustainability of the traditional management of Agave genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western México. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 60: 33-47.

Zwietering M, Jongenburger M, Rombouts F, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1875-1881.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO I. NORMAS

NOM-030-SCFI: Información comercial de cantidad en la etiqueta - Especificaciones.

NMX-V-013: Bebidas alcohólicas determinación de por ciento de alcohol en volumen (% Vol.) a 20°C.

NMX-V-014-S: Bebidas alcohólicas destiladas - Determinación de alcoholes superiores (aceite de fusel).

NMX-V-017: Método de prueba para la determinación de extracto seco y cenizas en bebidas alcohólicas destiladas.

NMX-V-021: Métodos de prueba para la determinación de metanol en bebidas alcohólicas.

NMX-Z-012: Método de muestreo.

NMX-V-005-NORMEX-2005: Bebidas Alcohólicas-Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores-Métodos de Ensayo (Prueba), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2005.

NMX-V-006-NORMEX-2005: Bebidas Alcohólicas-Determinación de azúcares reductores directos y totales-Métodos de Ensayo (Prueba), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2005.

NOM-117-SSA1-1994: Bienes y servicios-Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de agosto de 1995.

10.2 ANEXO II. ARTÍCULOS

10.2.1 Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.

10.2.2 Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*.

10.2.3 Scaling-up of mezcal fermentation using pure and mixed yeast cultures isolated from alcoholic spontaneous fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.