



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y COMPUESTOS  
CONGENÉRICOS UTILIZANDO 3 ESPECIES DE LEVADURAS, EN  
MOSTOS DE *AGAVE ANGUSTIFOLIA*.**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARLEN FLORES DIAZ.**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Olga Del Carmen Velázquez Madrazo.

**VOCAL:** Profesor: Francisco Ruíz Terán.

**SECRETARIO:** Profesor: Beatriz Ruíz Villafan.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Laura Carmona Salarazar.

**2° SUPLENTE:** Profesor: Hilda Elizabeth Calderón Villagómez.

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. LABORATORIO 321,  
EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Francisco Ruíz Terán.

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Hilda Elizabeth Calderón Villagómez.

### **SUSTENTANTE:**

Marlen Flores Díaz.



***“Cuando nuestras actitudes sobrepasen  
nuestras habilidades, aun lo imposible  
se hace posible” (Anónimo)***

## **Agradecimientos.**

Tengo tantas cosas que agradecer que sinceramente no creo que se ha suficiente este pequeño agradecimiento pero de antemano quiero agradecer a mis padres Pilar y David que me han dado todo su amor, apoyo y comprensión a mis hermanos Valeria e Iván porque siempre han estado ahí para ayudarme.

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México cuna de grandes pensadores por la enseñanza y el aprendizaje a todo aquel que se mece en sus brazos, agradezco al CCH por abrir esa pequeña puerta y llegar hasta la Facultad de Química mi segundo hogar que me ha enseñado a tropezar y levantarme de nuevo con más ganas de querer más de la vida.

También quiero aprovechar para agradecer a mis tíos y un último gran consejo que recibí de una tía y que estoy poniendo en práctica, a los sabios abuelos y aunque no esté físicamente sabemos que todos llevamos algo del abuelo Rafael, también quiero agradecer a mis primos por los buenos momentos.

Agradezco a la familia Reyes y García por abrimme las puertas de su hogar y brindarme su confianza y apoyo incondicional, también agradezco a la familia Rodríguez por dejarme pasar momentos agradables en su compañía.

Gracias a todos mis profesores por su infinita paciencia, por compartir su conocimiento y todas sus enseñanzas que me han dejado cada uno de ellos.

También quiero agradecer a los amigos a todos ellos que están y estuvieron a mi lado, a mis compañeros de aulas y a los compañeros del laboratorio 321 por las experiencias compartidas a su lado.

Quiero agradecer especialmente a Carlitos mi mejor amigo a mi apoyo y compañero de vida por estar a mi lado acompañándome en todo momento en todas mis decisiones y locuras que me ha tratado en todas mis facetas gracias a ti y a tu inmenso amor estamos en este punto para terminar esta aventura e iniciar una nueva "TE AMO" gracias por todo.

Estoy muy feliz por este logro sé que sin su apoyo y amor de todos ustedes esto no habría pasado gracias a todos.

***Marlen Flores Díaz***

***"Por mi raza hablara el espíritu"***

## **Índice**

<b>Resumen:</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción:</b> .....	<b>3</b>
<b>Antecedentes:</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Bebidas alcohólicas elaboradas con Agave</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 Levaduras y sus usos</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Métodos moleculares de identificación de levaduras.</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). .....	8
1.3.2 Método para la identificación de levaduras a nivel especie. Análisis de las regiones ribosomales. ....	11
1.3.3 Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP). ....	11
<b>1.4 Glucólisis y Fermentación alcohólica</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Qué es el mezcal.</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 El agave mezcalero</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7 Proceso de elaboración del mezcal.</b> .....	<b>20</b>
<b>1.8 Microorganismos en el mezcal</b> .....	<b>24</b>
<b>1.9 Factores que afectan al aroma y sabor del mezcal.</b> .....	<b>25</b>
<b>Justificación:</b> .....	<b>28</b>
<b>Objetivos.</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 Objetivo General:</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 Objetivos particulares:</b> .....	<b>29</b>
<b>Hipótesis:</b> .....	<b>30</b>
<b>Materiales y métodos.</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1 Identificación de las tres cepas de las levaduras aisladas</b> .....	<b>32</b>
3.1.1 Extracción del ADN de las tres cepas. ....	32
3.1.2 Identificación de las cepas por PCR-RFLP.....	32
<b>3.2 Fermentación de las tres cepas de las levaduras aisladas.</b> .....	<b>34</b>
3.2.1 Extracción del jugo de las piñas. ....	34
3.2.2 Preparación del mosto para las fermentaciones. ....	35
3.2.3 Esterilización de los tubos de fermentación.....	35
3.2.4 Inoculación de los tubos de fermentación.....	35
3.2.5 Fermentación. ....	37
3.2.6 Análisis de azúcares y ácidos orgánicos (por medio de HPLC).....	37

3.2.7	Análisis de etanol y compuestos volátiles.....	38
<b>Resultados .....</b>		<b>40</b>
4.1	<b>Resultados de la identificación de las cepas.....</b>	<b>40</b>
4.2	<b>Resultados de la fermentación.....</b>	<b>41</b>
4.2.1	Resultados de la fermentación de los azúcares.....	41
4.2.2	Resultados y rendimientos en la producción de etanol. ....	43
4.2.3	Resultados de las concentraciones de compuestos congénicos de ácidos orgánicos.....	47
4.2.4	Resultados de compuestos congénicos volátiles.....	50
<b>Conclusiones.....</b>		<b>54</b>
<b>Trabajo a futuro. ....</b>		<b>56</b>
<b>Bibliografía:.....</b>		<b>57</b>
<b>Referencias. ....</b>		<b>62</b>
<b>Anexo A. Curvas patrón empleadas para la determinación de azúcares, etanol y compuestos congénicos.....</b>		<b>65</b>

Índice de Figuras.

Figura 1.1	Plantas representativas y algunos rasgos morfológicos para diferenciar <i>A. tequilana</i> de <i>A. angustifolia</i> . (a) <i>Agave tequilana</i> (At). (b) <i>Agave angustifolia</i> (Aa). (c) Anchura de la hoja. (d) Longitud de la columna vertebral apical. (e). Distancia entre la última columna lateral y apical. (f) Distancia de la columna lateral ( Rodríguez-Garay, 2009). ....	6
Figura 1.5	Reacción en cadena de la polimerasa. (Andrade., 2006) .....	9
Figura 1.6	Estructura del ADN ribosomal nuclear eucarionte. (Fernández-Espinar y col, 2006) .....	11
Figura 1.7	Análisis de restricción región ITS-5.8S. (Andrade., 2006) .....	13
Figura 1.8	Fermentación gliceropirúvica. (Hidalgo., 2002).....	14
Figura 1.9	Fermentación alcohólica. (Hidalgo., 2002).....	14
Figura 1.10	Glicólisis y Fermentación alcohólica. (Hidalgo, 2002).....	16
Figura 1.12	Zonas de cultivo. Fuente <a href="http://uniradioinforma.com">http://uniradioinforma.com</a> .....	18
Figura 1.18	Proceso de elaboración del mezcal. (Escalante-Minakata y col, 2009).....	20
Figura 2.1	Cámara de Neubauer. Fuente <a href="http://212m-laboratoristaclinico.blogspot.mx">http://212m-laboratoristaclinico.blogspot.mx</a> .....	36

### *Índice de gráficas.*

Gráfica 4.1 Reducción de los grados Brix de la fermentación de las tres cepas y sus combinaciones .....	41
Gráfica 4.2 Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa de las tres cepas ....	42
Gráfica 4.3 Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa durante la fermentación de las combinaciones de las cepas .....	42
Gráfica 4.4 Producción de etanol durante la fermentación de las cepas en estudio .....	43
Gráfica 4.5 Rendimientos teóricos en la producción de etanol de las cepas en estudio .....	44
Gráfica 4.6 Rendimientos reales de la producción de etanol de las cepas en estudio .....	45
Gráfica 4.7 Donde se muestra la reducción del pH durante 15 días, de las tres cepas y sus combinaciones en estudio.....	47
Gráfica 4.8 Producción de ácido láctico de las cepas en estudio .....	48
Gráfica 4.9 Producción de ácido acético de las cepas en estudio .....	48
Gráfica 4.10 Cantidad de metanol observado en la fermentación .....	50
Gráfica 4.11 Producción de acetato de etilo .....	51
Gráfica 1B Muestra las concentraciones porcentuales de sacarosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.....	65
Gráfica 2B Curva estándar de glucosa. ....	65
Gráfica 3B Curva estándar de fructosa.....	66
Gráfica 4B Curva estándar de ácido láctico.....	66
Gráfica 5B Curva estándar de ácido acético.....	67
Gráfica 6B Curva estándar de metanol.....	67
Gráfica 7B Curva estándar de acetato de etilo .....	68
Gráfica 8B Curva estándar de etanol.....	68

### *Índice de Tablas.*

Tabla 1.1 Características del mezcal. (Lappe y col., 2008) .....	24
Tabla 3.1 Condiciones de amplificación para la región 5.8-ITS. (Cova., 2010) .....	33
Tabla 4.1 Tamaños de PCR y restricciones basadas en la amplificación del ITS-5.8. ....	40

# INTRODUCCIÓN

*"Hay tres cosas en la vida que no se puede perder:  
la esperanza, la paciencia y la honestidad" (Anónimo)*

## Resumen:

A pesar de la importancia que tiene la industria del mezcal en el país, el método de elaboración es rudimentario, el proceso de fermentación es espontáneo y los microorganismos que participan en la fermentación aún no están completamente caracterizados.

En el presente trabajo se hablará de las bebidas alcohólicas elaboradas a partir del *Agave*, de las levaduras y sus usos, los métodos moleculares de identificación de levaduras, algunas rutas metabólicas como la glucólisis y la fermentación alcohólica, el proceso de elaboración del mezcal, los microorganismos en el mezcal y de los factores que afectan al aroma y sabor del mezcal. Con el objetivo de identificar algunas levaduras participes en la elaboración del mezcal y comprobar que los compuestos congenéricos generados durante la fermentación caracterizan el sabor del mezcal en las diferentes zonas de producción.

## **Introducción:**

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no de diferentes clases de *Agave* que se produce en diferentes estados del país. En el estado de Oaxaca es donde se concentra la mayor cantidad de productores y de personas que dependen económicamente de esta actividad.

El mezcal es un líquido de olor y sabor de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo. (NOM-070-SCFI-1994).

El presente trabajo pretende la estandarización de la elaboración del mezcal de una forma más industrial, para realizar fermentaciones dirigidas, más controladas y se podría elaborar un mezcal con ciertas características organolépticas, seleccionando a los microorganismos que produzcan un perfil sensorial que se requiera lograr según las características deseadas.

# ANTECEDENTES

- 1.1. Bebidas alcohólicas elaboradas con agave
- 1.2. Levaduras y sus usos
- 1.3. Métodos moleculares de identificación de levaduras
- 1.4. Glucólisis y fermentación alcohólica
- 1.5. Qué es el mezcal
- 1.6. El agave mezcalero
- 1.7. Proceso de elaboración del mezcal
- 1.8. Microorganismos del mezcal
- 1.9. Factores que afectan el aroma y el sabor del mezcal

*“La adquisición de cualquier conocimiento  
es siempre útil al intelecto,  
que sabrá descartar lo malo  
y conservar lo bueno”  
(Leonardo Da Vinci)*

## **Antecedentes:**

### **1.1 Bebidas alcohólicas elaboradas con *Agave*.**

En México existe una extensa variedad de bebidas tradicionales producidas en distintas regiones, como lo son: la bacanora, charanda, mezcal, mistela, tequila, pulque, sotol, tejuino, tepache, entre otras; esta diversidad de bebidas alcohólicas tienen una gran relevancia por su impacto social, cultural y económico en las diferentes comunidades donde se producen (Cova, 2010).

Desde tiempos prehispánicos, el *Agave* ha sido considerado como una de las plantas más importantes y ampliamente utilizadas en México, pues debido a su gran valor biológico, ecológico y económico ha sustentado el establecimiento y desarrollo de distintas comunidades por mucho tiempo (Lappe y col, 2008).

En la actualidad diferentes especies de *Agave* son explotadas para la producción de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas, que tienen reconocimiento tanto nacional como internacional, algunas de estas bebidas son:

- No destiladas: Pulque, el cual se obtiene después de fermentar la savia natural del *Agave* comúnmente conocida como agua miel, que es un líquido amarillento de sabor dulce.
- Destiladas: Se obtienen a partir de la destilación de mostos fermentados preparados con azúcares provenientes de *Agave* de diferentes especies; estos mostos pueden ser o no enriquecidos con otros azúcares hasta en una proporción no mayor del 49% de azúcares reductores totales (Lappe y col, 2008).

El tequila y el mezcal son los principales representantes de este tipo de bebidas, la diferencia entre ellas es la especie de *Agave* del cual se obtiene; mientras que para la elaboración de tequila sólo se permite el uso de *Agave tequilana* Weber variedad *azul*, en el caso del mezcal se permiten distintas especies de *Agave* (Figura 1.1).

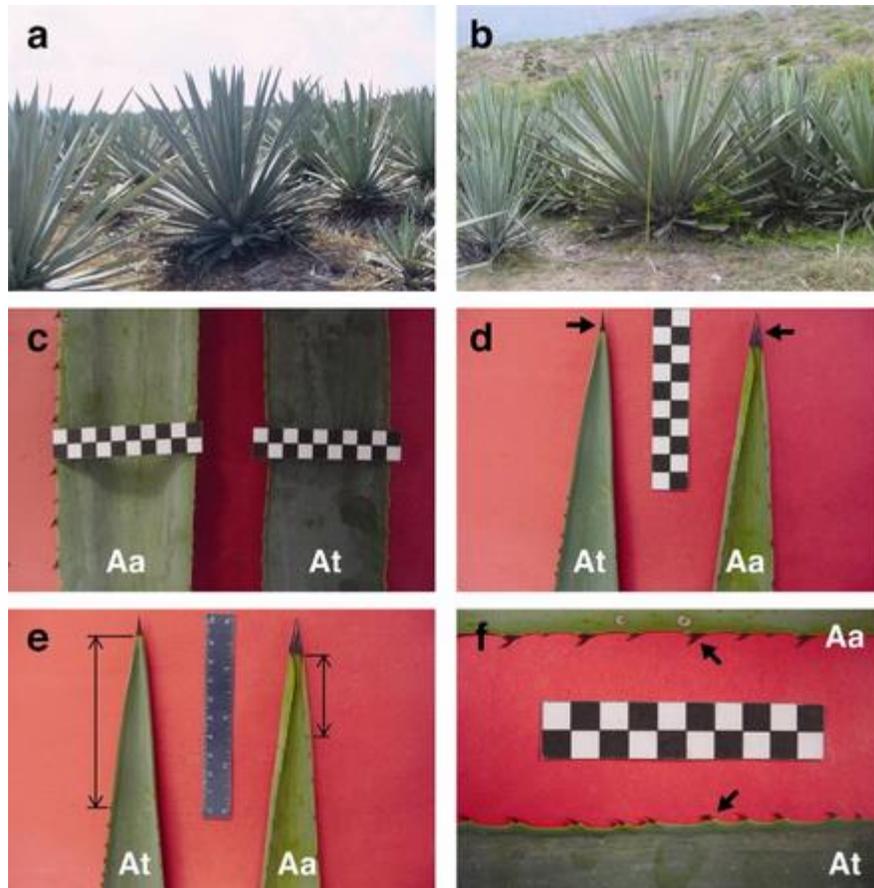


Figura 1.1 Plantas representativas y algunos rasgos morfológicos para diferenciar *A. tequilana* de *A. angustifolia*. (a) *Agave tequilana* (At). (b) *Agave angustifolia* (Aa). (c) Anchura de la hoja. (d) Longitud de la columna vertebral apical. (e). Distancia entre la última columna lateral y apical. (f) Distancia de la columna lateral ( Rodríguez-Garay, 2009).

## **1.2 Levaduras y sus usos**

Las levaduras son microorganismos unicelulares que existen en ocasiones como pequeños arreglos de células y viven por lo general en ambientes fluidos, aunque hay excepciones por ejemplo el ser humano (Collado, 2001).

Poseen un gran tamaño celular entre 10-100  $\mu\text{m}$ , una composición química de la pared a base de quitina, hemicelulosa o celulosa y un metabolismo quimioorganotrófico, sin embargo su reproducción es casi siempre asexual. Las levaduras son organismos que pueden cambiar su metabolismo de oxidativo a fermentativo por lo que se les incluye en el grupo de los aerobios facultativos (Collado, 2001).

Las levaduras se utilizan en la producción, enriquecimiento y preservación de alimentos. Se utiliza en la producción de etanol, de vitaminas del complejo B, en la producción de diferentes proteínas, hormonas (principalmente esteroideas) utilizadas en medicina, en la producción de algunos colorantes como la astaxantina que se utiliza para dar el color rosa a la carne de salmones y truchas criados en cautiverio, así como la producción de biomasa para panificación y como alimento para animales. Además de estos usos las levaduras tienen una aplicación agroindustrial (Astromoff, 2000).

## **1.3 Métodos moleculares de identificación de levaduras.**

Tradicionalmente para la identificación y clasificación de las levaduras se han utilizado métodos basados en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Cova, 2010).

- ✓ Pruebas morfológicas como es el aspecto de la colonia, estado sexual o asexual, presencia de homo y heterotalismo, entre otras.

- ✓ Pruebas fisiológicas y bioquímicas, como asimilación y fermentación de diversas fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, termotolerancia, análisis total de proteínas y análisis de los patrones de isoenzimas.

Las características morfológicas pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, por lo que los resultados obtenidos tienen un cierto grado de incertidumbre. Además la reproducibilidad de estas técnicas es cuestionable pues en muchos casos dependen del estado fisiológico de la levadura. (Fernández-Espinar y col, 2006; Orberá y col, 2004).

Una alternativa al uso de estos métodos tradicionales de identificación son las técnicas moleculares, éstas permiten analizar el genoma independientemente del estado fisiológico de las levaduras, dejando en segundo plano el análisis de rasgos fenotípicos.

### **1.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR puede utilizarse como un método de identificación por sí mismo cuando se utilizan cebadores especie o género específicos. Sin embargo su principal aporte a la identificación de levaduras es constituirse como un punto de partida para diferentes métodos moleculares, pues permite la obtención de un número de copias elevado de una secuencia o gen en particular (eliminando la necesidad de trabajar con todo el genoma) siempre que se conozcan los extremos de la misma, esta secuencia puede ser amplificada en poco tiempo, de manera selectiva incluso en una matriz compleja, con cantidades mínimas del templado de ADN.

Esta reacción se basa en la capacidad que tienen las ADN polimerasas de replicar *in vitro* una cadena molde o templado partiendo de una mezcla que

contiene un exceso de desoxirribonucleótidos (dNTPs) y de fragmentos de secuencia llamados cebadores o primers que corresponden a los extremos 3' de la secuencia diana y que sirven como iniciadores de la reacción; esta consiste en múltiples ciclos de tres reacciones primarias que permiten la multiplicación de la secuencia molde (Figura 1.2).

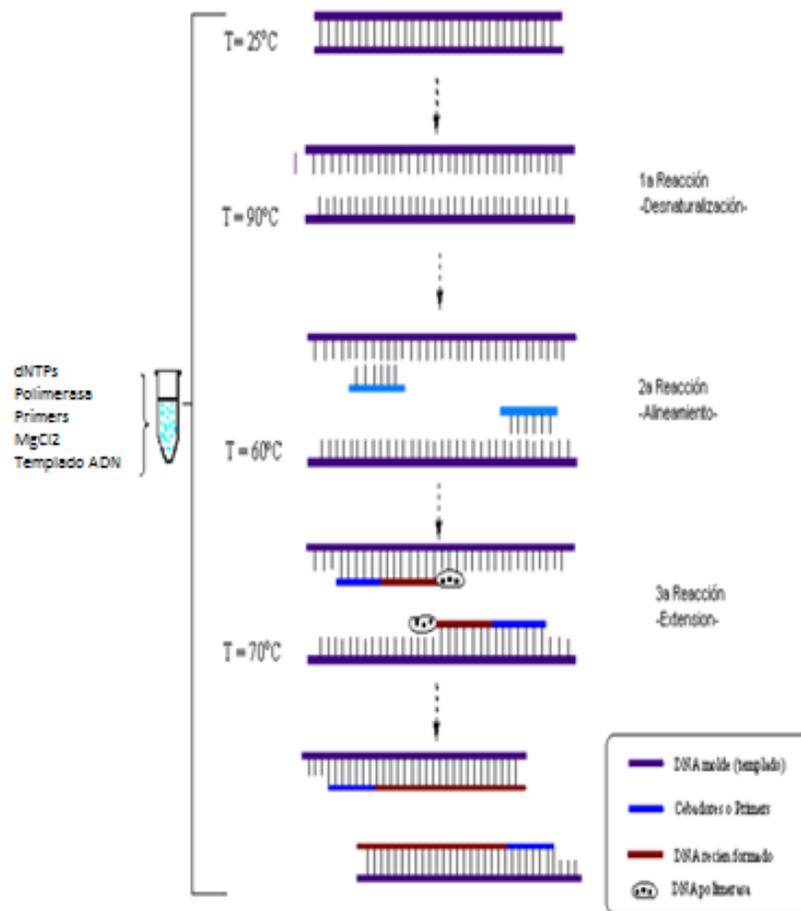


Figura 1.2 Reacción en cadena de la polimerasa. (Andrade., 2006)

**Desnaturalización:** en esta etapa se utiliza una temperatura (usualmente  $95^{\circ}\text{C}$ ) para desnaturalizar o separar las cadenas que conforman la doble hélice del ADN.

**Alineación:** en la etapa de alineación, una disminución de la temperatura hasta valores de entre  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$  permite la hibridación de los cebadores o primers con la hebra molde. Las cadenas del templado no se reasocian entre

sí debido a la baja concentración de las mismas en relación con los cebadores y las condiciones de astringencia.

Extensión: en la tercera reacción de cada ciclo, la temperatura se establece al óptimo de catálisis para permitir a la ADN polimerasa sintetizar la cadena utilizando los cebadores y generando nuevas hebras de ADN a través de la polimerización de los dNTPs. Cuando ha terminado la extensión concluye también el primer ciclo de una reacción de PCR. Después se eleva la temperatura para llevar a cabo una nueva reacción de desnaturalización, que marca el inicio de otro ciclo en el cual no sólo se amplifican las moléculas originales del templado sino que también aquéllas que se acaban de formar. A partir del segundo ciclo comienzan a sintetizarse hebras de la longitud deseada que superan rápidamente al templado original.

En la reacción de PCR se pueden variar factores como temperaturas y tiempos de alineamiento, pueden elegirse los primers adecuados o diseñarse si no existen, también puede escogerse una variedad de polimerasas que cambian en los intervalos de temperatura en los que son activas y en la fidelidad con la que polimerizan las nuevas cadenas de ADN, todo esto para cubrir las necesidades de la reacción que se necesita. Las reacciones de PCR son particularmente susceptibles a la contaminación por ADN externo, además de la contaminación, la reacción puede inhibirse por múltiples factores que van desde las condiciones de reacción, las concentraciones de reactivos, hasta inhibidores externos que pueden estar presentes en la muestra de donde se extrajo el ADN o en el material de laboratorio como los guantes, puntas de micropipetas o micropipetas (Rossen et al 1992).

### 1.3.2 Método para la identificación de levaduras a nivel especie. Análisis de las regiones ribosomales.

Los genes ribosomales de las levaduras (5S, 5.8S, 18S Y 26S) están agrupados en *tándem* formando unidades transcripcionales que se repiten de 100 a 200 veces en el genoma. En cada unidad transcripcional se encuentran regiones espaciadoras, espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2) espaciadores externos transcritos (ETS) y espaciadores no transcritos (NTS) los cuales separan a las unidades codificantes (Figura 1.3).

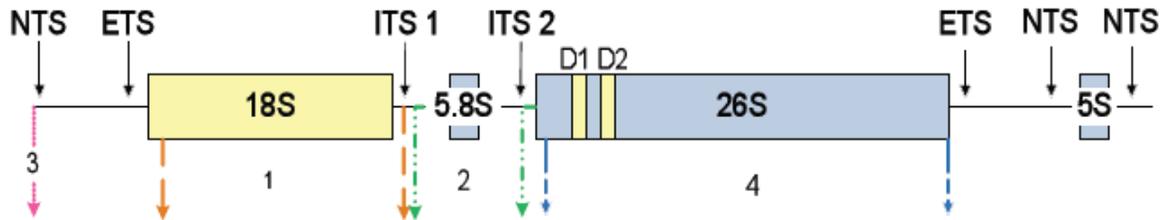


Figura 1.3 Estructura del ADN ribosomal nuclear eucarionte. (Fernández-Espinar y col, 2006)

### 1.3.3 Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP).

La determinación del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma cuando éste es cortado por enzimas de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas; así como la existencia de patrones únicos lo que permite la identificación.

Una variante de esta técnica conocida como PCR-RFLP, ha sido utilizada ampliamente en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial; para ello se amplifican fragmentos específicos de ADN por PCR que luego son tratados con enzimas de restricción para obtener los patrones

específicos que permiten la identificación (Orberá y col, 2004; Fernández y col, 2006). Algunas de las regiones ribosomales que se amplifican (indicadas con líneas punteadas en la Figura 1.6) son:

1. **18S-ITS1**: Utilizando las enzimas *AhuI*, *HaeIII*, *MspI*, y *RsaI* se pueden identificar hasta 128 especies de levaduras. (Dlachy y col, 1999).
2. **ITS-5.8S-ITS2**: (Esteve y col, 1999) Propone el uso de las enzimas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* para identificar 191 especies de levaduras.
3. **NTS, NTS-18-S, y NTS-ITS**: El análisis por PCR-RFLP de estas regiones permiten identificar a las especies del género de *Saccharomyces sensu stricto*.
4. **Gen 26S**: (Baleiras y col, 2005) proponen el análisis de restricción de este gen como un método rápido para la identificación de levaduras *no Saccharomyces* involucradas en la fermentación de bebidas alcohólicas.

En particular, el análisis de restricción de la región ITS-5.8S permite identificar a distintas especies de levaduras: debido a que la región 5.8S es conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica además de ser codificadora: mientras que los ITS son regiones hipervariables y no codificadoras. Las secuencias más conservadas (5.8S) son útiles para la clasificación de altos niveles taxonómicos (por ejemplo género), mientras que las regiones hipervariables (ITS) son utilizadas a nivel de especie y subespecies (Figura 1.4).

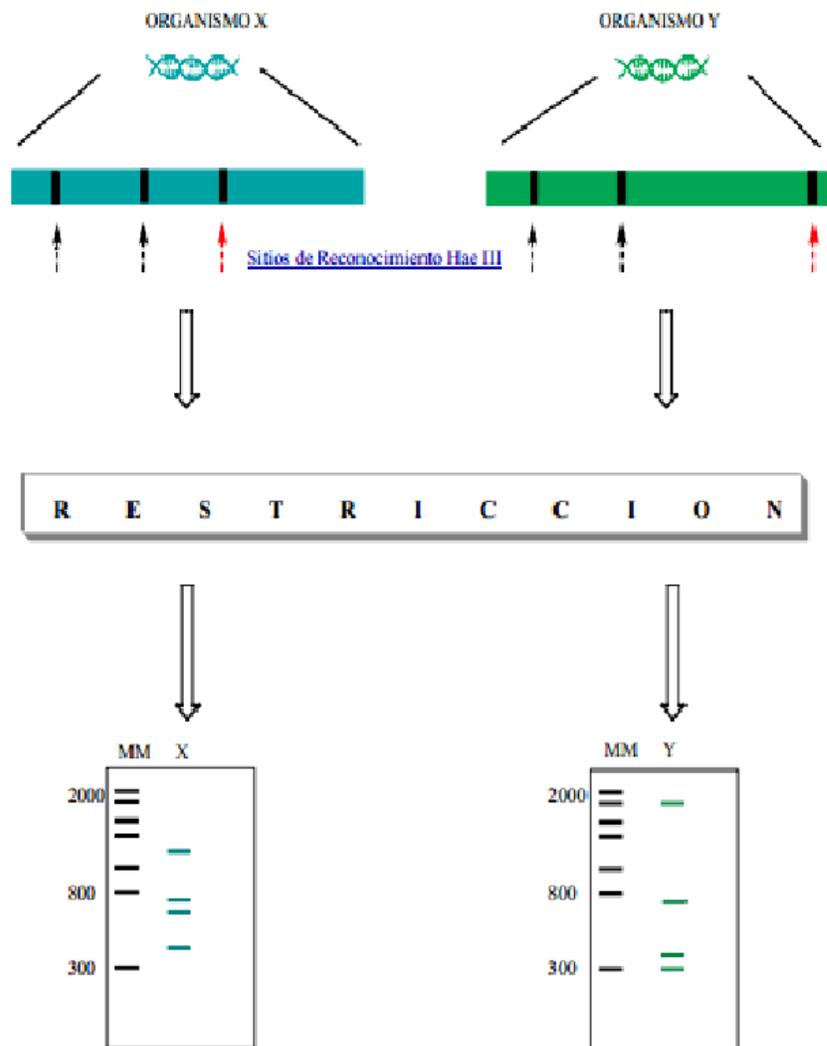


Figura 1.4 Análisis de restricción región ITS-5.8S. (Andrade., 2006)

#### 1.4 Glucólisis y Fermentación alcohólica.

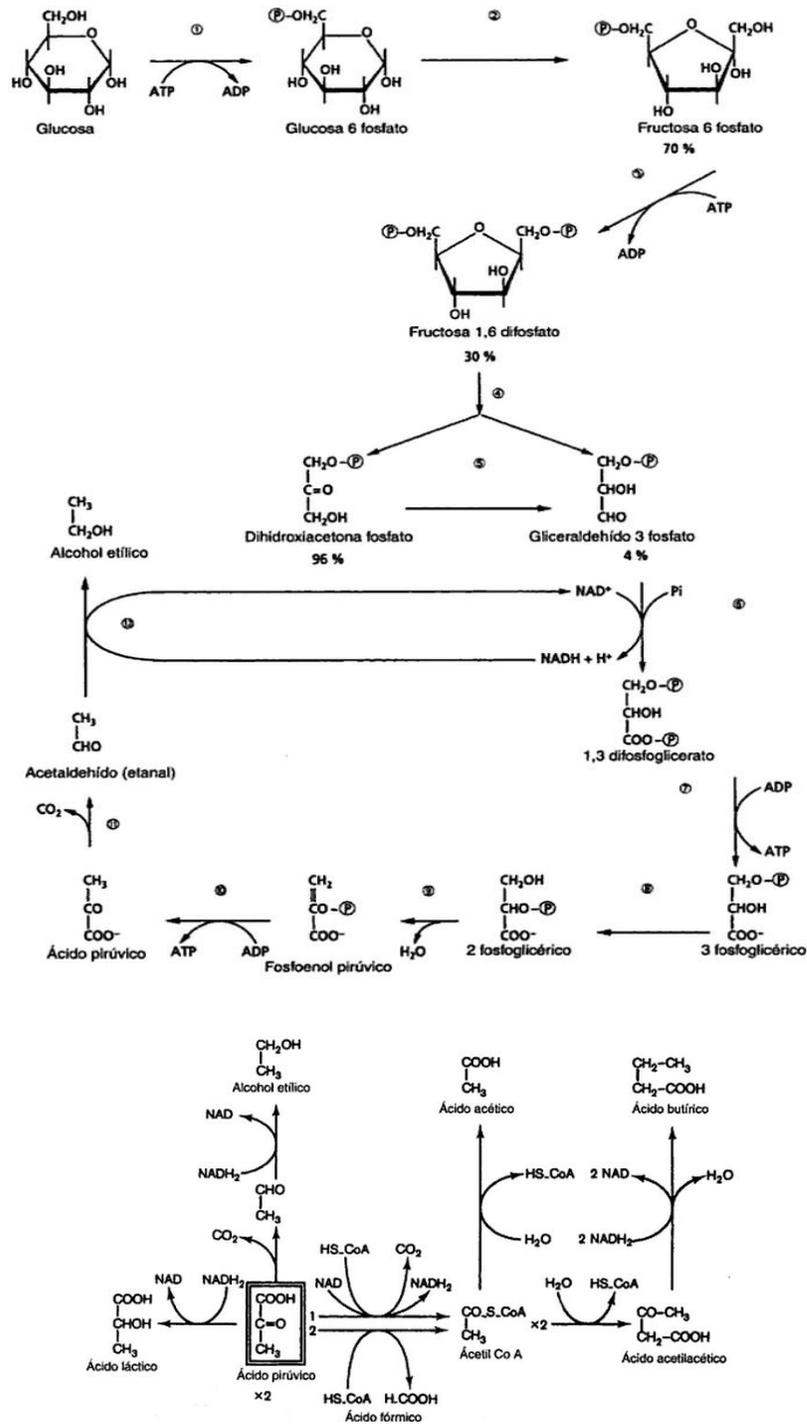
La glucólisis o vía de Embden-Meyerhof, es el conjunto de reacciones bioquímicas que permite a las células vivas, la transformación de los azúcares de 6 átomos de carbono, como la glucosa y la fructosa, en ácido pirúvico. Estas reacciones se producen tanto en la respiración como también en anaerobiosis en las fermentaciones, siendo un paso previo común.



la energía necesaria para formar las dos moléculas de ATP. Durante el paso siguiente las dos moléculas de ácido pirúvico son reducidas por dos moléculas de NADH para formar dos moléculas de ácido láctico. Dado que el ácido láctico es el producto final de la reacción, este compuesto experimenta una oxidación ulterior y la mayor parte de la energía producida por la reacción permanece almacenada en el ácido láctico (Tortora., 2007).

La formación de ácido acético se explica por dos vías bioquímicas, la primera a partir de ácido pirúvico, que con el cofactor CoA-SH forma acetilcoenzima A, el cual por último es transformado en ácido acético.

La segunda es a partir del acetaldehído, compuesto que se forma inmediatamente antes del etanol, que se transforma directamente por oxidación en ácido acético. Ambos mecanismos están muy ligados a la síntesis de lípidos, los cuales dependen de la formación de la acetilcoenzima A, por lo que las levaduras que producen una menor tasa de ácido acético son aquellas que sintetizan mayores cantidades del primer compuesto.



- |  |                              |
|--|------------------------------|
| 1. Hexoquinasa.                              | 7. Fosfoglicéricoquinasa.    |
| 2. Fosfoglicosa isomerasa.                   | 8. Fosfogliceromutasa.       |
| 3. Fosofructoquinasa.                        | 9. Enolasa.                  |
| 4. Aldolasa.                                 | 10. Pirúvicoquinasa.         |
| 5. Triosafofata isomerasa.                   | 11. Pirúvico descarboxilasa. |
| 6. Glicer aldehído 3 fosfato deshidrogenasa. | 12. Alcohol deshidrogenasa.  |

Figura 1.7 Glucólisis y Fermentación alcohólica. (Hidalgo, 2002)

## 1.5 Qué es el mezcal.

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no.

Según la NOM-070-SCFI-1994 el mezcal es un líquido de olor y sabor de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo.

La palabra mezcal viene del náhuatl “metl” e “ixcalli” que significa “agave cocido al horno”, (Luna, 1991; Blomberg, 2000) el corazón del agave cocido era utilizado en tiempos prehispánicos para preparar una bebida de bajo contenido alcohólico hasta que los españoles introducen la destilación en el proceso de elaboración del mezcal.

Según la Norma Oficial Mexicana se establece como región productora de mezcal a la comprendida por los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero, Durango, Tamaulipas, Guanajuato (Figura 1.8) y especialmente el estado de Oaxaca en donde se encuentra la denominada “Región del mezcal” que abarca los municipios de Miahuatlán, Tlacolula, Yautepec, Ocotlán, Ejutla, Zimatlán y Sola de Vega.



Figura 1.8 Zonas de cultivo.  
(Secretaría de economía, 2008)

En el año 2008 en México se contaban con 150 marcas registradas de las cuales sólo cincuenta estaban preparadas para ser exportadas, cabe mencionar que del total de la producción de mezcal, sólo un millón fue certificado por cumplir las normas oficiales de elaboración y envasado, de éstas, la mitad se vendió en el extranjero, en particular 80% a Estados Unidos, la restante fue para autoconsumo. La producción anual de mezcal alcanzó los seis millones de litros con un valor de la producción evaluada en ciento ochenta millones de pesos (Secretaría de economía, México, 2008).

## 1.6 El agave mezcalero.

Las plantas utilizadas para elaborar mezcales se llaman agaves o magueyes y pertenecen a la familia botánica de las **Agavaceas**. Esta familia de plantas es endémica del continente Americano, incluye nueve géneros y casi 330 especies diferentes. El género **Agave** es el más representativo y diverso con 200 especies, de las cuales 150 se distribuyen en México, y 104 son endémicas del territorio nacional (García Mendoza, 2007).

Los agaves se distribuyen en todo el continente, de manera silvestre o cultivada, en México se cuentan con 330,000 hectáreas de maguey de las cuales 40,000 son cultivadas y 290,000 son silvestres. Se presentan y desarrollan mejor en ambientes áridos y semisecos aunque también, como ornamento, se adaptan a ambientes templados y húmedos (García Mendoza, 2007).

El nombre **Agave** proviene del griego y significa “admirable”. Este nombre fue elegido por Carl von Linneo, para clasificar a la familia botánica de los magueyes en el año 1753. (García Mendoza, 2007).

## 1.7 Proceso de elaboración del mezcal.

El proceso de producción de mezcal tradicional se compone de cinco etapas:

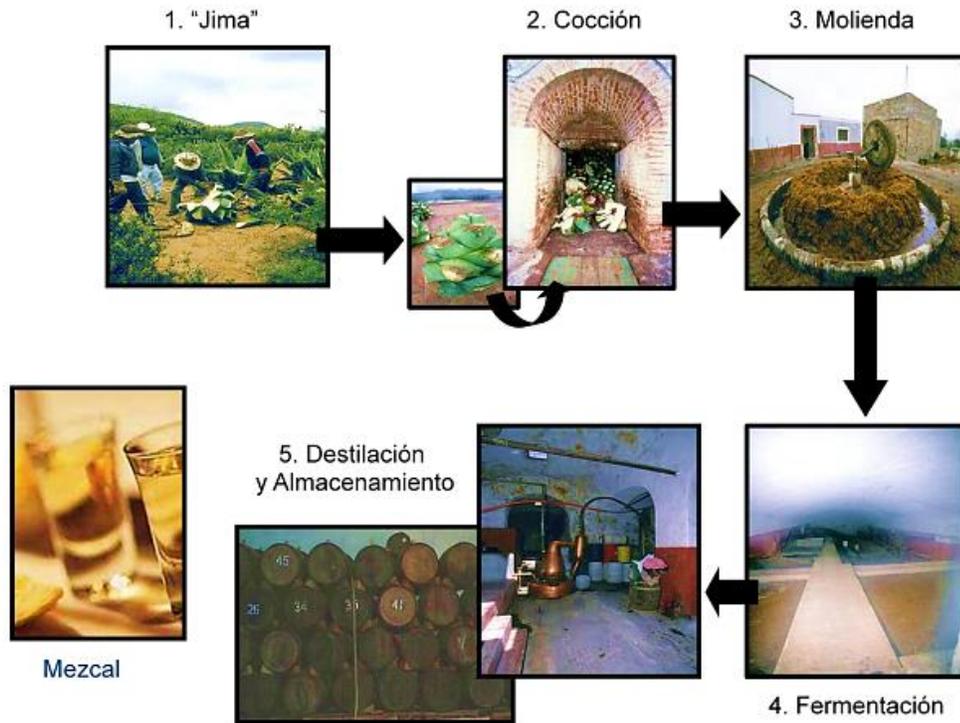


Figura 1.9 Proceso de elaboración del mezcal. (Escalante-Minakata y col, 2009)

### 1. Jima del agave mezcalero.

El proceso para la elaboración del mezcal comienza cuando la planta ha alcanzado su estado de madurez alrededor de 10 años y es "jimada"; proceso que consiste en retirar las hojas o pencas de la planta para obtener el corazón o piña. Posteriormente es transportada a la fábrica para su procesamiento.

### 2. Cocción de las piñas de agave.

Después de la recolección de las piñas se lleva a cabo el proceso de cocción el cual puede realizarse en hornos de piso, de mampostería o en autoclaves cuyo objetivo principal es la hidrólisis de los fructanos. Estos representan el

60% del total de los carbohidratos solubles presentes en la planta. La inulina es un oligofructano con enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y constituye el carbohidrato de reserva de *A. tequilana*, *A. americana*, *A. mapisaga*, *A. antroviensis* y *A. salmiana*. Entre las especies de *Agave* se presentan diferencias en la distribución de otros carbohidratos solubles como sacarosa, fructosa y glucosa. Esto se debe a las características ambientales que prevalecen en las regiones donde son cultivadas o cosechadas (Mancilla & López, 2006).

Durante el proceso térmico, las fibras se ablandan lo que facilita la molienda y la extracción del jugo que contiene azúcares simples, principalmente fructosa, que es fácilmente metabolizada por las levaduras y bacterias alcohologénicas (Segura, 2010; López y col, 2003). En ésta etapa también ocurren reacciones de caramelización o de Maillard que forman compuestos como 3-metil-1-butanol y alcohol fenilético (Mancilla & López, 2006). El sobrecalentamiento de los azúcares incrementa la concentración de furfural dando un sabor a ahumado y el exceso de caramelización reduce el rendimiento de etanol (Cedeño, 1995).

En el estado de Oaxaca, la cocción se realiza en hornos de piso (Segura., 2010) y en la región de Zacatecas-San Luis Potosí se lleva a cabo en hornos de mampostería principalmente, aunque ya hay empresas que utilizan autoclaves de acero.

### 3. Molienda de las piñas cocidas.

Como siguiente etapa, las cabezas de las plantas cocidas se muelen con el objeto de extraer los azúcares fermentables. Esta molienda se realiza de dos maneras: Mediante una *tahona* (molino de piedra) como el que se muestra en la (Figura 1.9) o con la acción de molinos mecánicos.

El subproducto generado (bagazo) representa cerca de un 40% del peso total. Una vez que se ha extraído el jugo se procede a preparar el mosto.

Esto se hace ajustando el grado de sólidos disueltos en el medio para tener una concentración de azúcares que puede ir de 4 a 10% (p/v).

#### 4. Fermentación de las piñas del agave.

Durante la etapa de la fermentación se emplea comúnmente el mosto ajustado a una concentración definida de sólidos disueltos, el inóculo formado por la microbiota nativa. Otro aspecto importante que se debe tomar en cuenta durante el proceso fermentativo es el comportamiento de los consorcios de levaduras y bacterias.

Las variables analizadas son denominadas estados, como la concentración de microorganismos, concentración del producto, concentración de sustrato y en algunos casos la concentración interna de enzimas (Escalante & Ibarra, 2007).

Las bebidas fermentadas que se producen de forma tradicional como el mezcal, se obtienen mediante fermentaciones espontáneas, es decir, no se añaden inóculos comerciales sino que actúan los microorganismos naturales presentes en el sustrato.

Durante éste tipo de fermentaciones no se obtiene el producto de la acción de una única especie, ya que en ellas se llevan a cabo procesos bioquímicos muy complejos, en los que intervienen e interaccionan levaduras y bacterias (Torija y col, 2002).

El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los siguientes

factores: La región de origen de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH, (Torija y col, 2002).

#### 5. Destilación del mosto fermentado.

Para la destilación se utilizan alambiques de cobre, construidos completamente de cobre laminado para aumentar su resistencia y conseguir una superficie lisa.

El alambique se compone de una olla (es común que tenga capacidad de 1100 litros) en la que se colocan los mostos fermentados, por encima de la olla se encuentra la cabeza o turbante que recoge los gases y los conduce a los platos refinadores, pasando posteriormente al refrigerante donde se enfrían y licuan los gases al pasar por un serpentín sumergido en una pileta de agua.

El proceso finaliza cuando el alcoholómetro colocado a la salida del serpentín indica aproximadamente 3% (v/v). A lo largo del proceso de destilación se obtienen tres fracciones principales: las cabezas, el corazón y las colas.

Las primeras fracciones del destilado que constituyen las cabezas son ricas en etanol pero también en compuestos volátiles indeseables (acetato de etilo, etanal, metanol, etc.), después continua la segunda fracción o corazón hasta aproximadamente un 60% (v/v), que será el futuro mezcal y finalmente se obtienen los compuestos de alto peso molecular.

Posteriormente, el destilado es estandarizado con agua con base en la norma mexicana de bebidas alcohólicas y el producto terminado se almacena (González, 2005).

## 1.8 Microorganismos en el mezcal.

El proceso de producción de las bebidas elaboradas a partir de agave involucra una fermentación compleja, donde participan poblaciones mixtas de bacterias (lácticas y acéticas) y levaduras (no *Saccharomyces* y *Saccharomyces*). Esta microbiota es la responsable de la producción de la mayoría de los compuestos químicos y volátiles que confieren las características sensoriales del producto final (Lappe y col, 2008). En la Tabla 1.1 se resumen algunas características del mezcal.

Tabla 1.1 Características del mezcal. (Lappe y col, 2008)

Mezcal.	
<b>Tipo de bebida</b>	Destilada
<b>Especie de agave/ Estado de producción</b>	<i>A.salmiana</i> San Luis Potosí <i>A.angustifolia</i> Oaxaca <i>A.karwinskii</i> Oaxaca <i>A. marmorata</i> Oaxaca <i>A.potatorum</i> Oaxaca
<b>Substrato</b>	Mosto del jugo de Agave.
<b>Microbiota funcional</b>	Levaduras: no- <i>Saccharomyces</i> ( <i>Candida</i> spp. <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia caribbica</i> , <i>P. guilliermondii</i> ) y <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Productos de fermentación</b>	Etanol, ácidos orgánicos, ésteres, terpenos, aldehídos

## **1.9 Factores que afectan al aroma y sabor del mezcal.**

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila, mezcal, entre otras), son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no-volátiles, cuya mezcla compleja define sus atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor (López, 1999; Cole y Noble, 2003). En el mezcal y en el tequila hay compuestos volátiles (aromáticos) en concentraciones relativamente altas (volátiles mayoritarios), principalmente metanol y alcoholes superiores (Lachenmeier y col, 2006) que son tóxicos, por lo que están regidos por las normas oficiales mexicanas NOM-070-SCFI-1994 y NOM-006-SCFI-2005. Además, contienen volátiles en concentraciones bajas (volátiles minoritarios), como ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos (López, 1999; De León- Rodríguez y col, 2006), que contribuyen al aroma del mezcal y del tequila. Los compuestos volátiles tienen diferente origen: a) Pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo; o b) Pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Pinal y col, 1997; Cole y Noble, 2003).

Durante el proceso fermentativo se desarrollan la mayor cantidad de compuestos volátiles que son obtenidos mediante la destilación de los mostos. Durante la permanencia de los destilados en barricas de roble blanco o encino se llevan a cabo una serie de reacciones químicas que transforman al producto adquiriendo características organolépticas propias.

En este sentido, el impacto sensorial está relacionado con la presencia de compuestos volátiles. El aroma puede provenir de la planta llamado aroma primario que incluye dos subcategorías: El varietal (compuestos volátiles libres presentes en la planta que dependen de la variedad utilizada y sus características) y el prefermentativo (aromas que se liberan de su

combinación con otras sustancias llamadas precursores, debido a la actividad enzimática provocada por la tecnología aplicada). El aroma secundario proviene de los microorganismos que se desarrollan durante la primera fermentación; está ligado a la presencia de ciertos tipos de enzimas y es el aroma mayoritario. El aroma terciario o post-fermentativo es el que se forma durante el añejamiento. Este último se desarrolla mediante reacciones químicas y/o bioquímicas a partir de aromas de etapas anteriores (Riu, 2005). De ahí que los compuestos volátiles presentes en los mezcales provienen en principio de la planta y se van acumulando a lo largo del proceso. (Peña-Álvarez y col, 2004).

# Planteamiento de la investigación

- 2. Justificación
- 2. Objetivos
- 2. Hipótesis

***Después de todo,  
cualquier tipo  
de conocimiento  
implica auto-conocimiento.  
(Bruce Lee)***

## **Justificación:**

Debido a la naturaleza artesanal del proceso de producción del mezcal, en Oaxaca es frecuente encontrar tantos procesos como “palenques” (fabricas artesanales), lo que da lugar a diferentes calidades de materias primas y a modificaciones en los procesos, entre otros factores. En este proyecto se trabajó con fermentaciones controladas, simulando lo más parecido a la elaboración del mezcal artesanal para dar un paso previo a la estandarización del proceso de elaboración del mezcal ya que durante el proceso fermentativo se desarrollan la mayoría de los compuestos congénicos que dan características de aroma y sabor al mezcal debido a la microbiota presente en los mostos del *Agave*, de esta manera el proceso fermentativo está más controlado y se facilita la identificación de compuestos generados en la fermentación por cada una de las levaduras y sus combinaciones.

## Objetivos.

### 2.1 Objetivo General:

- Evaluar la producción de etanol y compuestos congenéricos que se generen durante la fermentación en el mosto de *Agave angustifolia* utilizando tres levaduras por separado y sus combinaciones.

### 2.2 Objetivos particulares:

- Identificar 3 cepas de levaduras de la región productora de mezcal en Oaxaca empleando los patrones de restricción de la región ITS-RNAr 5.8S (RFLP) utilizando las enzimas HaeIII, HhaI y HinfII.
- Evaluar el consumo de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) de las tres levaduras y sus combinaciones durante la fermentación del mosto de *Agave angustifolia*.
- Determinar los compuestos congenéricos que se producen durante la fermentación del mosto de *Agave* utilizando de manera individual a las levaduras identificadas.
- Determinar cuál levadura produce mayor cantidad de etanol en los mostos de *Agave angustifolia*.

## **Hipótesis:**

Si las levaduras que llevan a cabo la fermentación en el mosto de *Agave angustifolia* producen diferentes compuestos congenéricos, entonces se podrán producir mostos con distintos compuestos dependiendo de las levaduras que se ocupen en la fermentación, dando como resultado un mezcal con distintas características organolépticas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Identificación de las tres cepas de las levaduras aisladas

3.2 Fermentación de las tres cepas de las levaduras aisladas

*La acción es el fruto propio del conocimiento.*

*(Thomas Fuller)*

## **Materiales y métodos.**

### **3.1 Identificación de las tres cepas de las levaduras aisladas.**

#### **3.1.1 Extracción del ADN de las tres cepas.**

Con la punta de una micropipeta de 100µL se tomaron las células de colonias aisladas cultivadas en medio YPD a 28°C durante 24 horas y se colocaron en tubos Eppendorf. Para romper la pared y la membrana se agregó en los tubos Eppendorf 150µL de buffer TE (Tris-HCl pH 8.0 EDTA 1mM Sigma) y 0.3 g de perlas de vidrio de 425-600µm (Sigma). Se añadieron 150µL de PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, Sigma), posteriormente la mezcla se llevó a un disruptor de células (Disruptor Genie SI-D236) durante 35s. Después se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf), el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo Eppendorf (Cova, 2010).

Una vez extraído el ADN se procedió a verificar la extracción en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) durante 30 minutos a 100V, utilizando buffer TBE 0.5X. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µL), los resultados se visualizaron en un foto documentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas utilizando el programa Kodak MI 5.0 SE.

#### **3.1.2 Identificación de las cepas por PCR-RFLP.**

Para identificar a las cepas se utilizó el método de PCR-RFLP de las regiones ITS1-5.8-ITS2 (Esteve-Zarzoso y col, 1999), para la reacción de PCR se empleó un termociclador PIKO (Thermo Scientific) utilizando los siguientes reactivos: 1) Cebadores [0.5 µM] (Invitrogen) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGATATGC-3'), 2) ADN templado [~50ng/ µL], 3)DNTPs [10 µM] (Invitrogen), 4)Taq

polimerasa recombinante [1U] (Invitrogen), 5) Buffer [1X] para PCR (Invitrogen), 6) MgCl<sub>2</sub> [1.5 mM] (Invitrogen). El volumen final de la reacción fue de 50 µL. El programa de temperatura utilizado para cada par de cebador se describe a continuación.

Tabla 3.1 Condiciones de amplificación para la región 5.8-ITS. (Cova, 2010)

Cebadores	Programa de temperaturas
ITS 1 ITS 4	Desnaturalización inicial de 5 min a 95°C y después 35 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 95°C, 2 min de alineamiento a 52°C y 2 min de extensión a 72°C, seguidas por una extensión final de 10 min a 72°C

El producto de amplificación se separó por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) en el gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5X a 100V durante 30 minutos, utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb (Trackit ADN ladder Invitrogen). Los geles se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad) y las imágenes fueron captadas y analizadas utilizando el programa Kodak MI 5.0 SE (Cova, 2010).

Para el análisis de restricción se tomaron alícuotas de 10 µL del producto de PCR, a los cuales se le agregaron 2.5 µL de buffer de restricción y 1U de la respectiva enzima de restricción, el volumen final de reacción se ajustó en 25 µL; la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 horas. Las enzimas de restricción utilizadas para la región 5.8ITS fueron *HaeIII* y *HinfI* (Roche). Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) a 70V durante 90 minutos en gel de agarosa al 2%, utilizando buffer de corrida TBE 0.5X y un marcador de 1Kb de peso molecular (Trackit ADN ladder Invitrogen). Como revelador se utilizó bromuro de etidio, los fragmentos de restricción se visualizaron en un fotodocumentador (Fluor S Multi Imager, Bio-Rad), las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Kodak Bio-Rad. (Cova, 2010).

### 3.2 Fermentación de las tres cepas de las levaduras aisladas.

La fermentación se realizó siguiendo el procedimiento que a continuación se describe (diagrama 3.1).

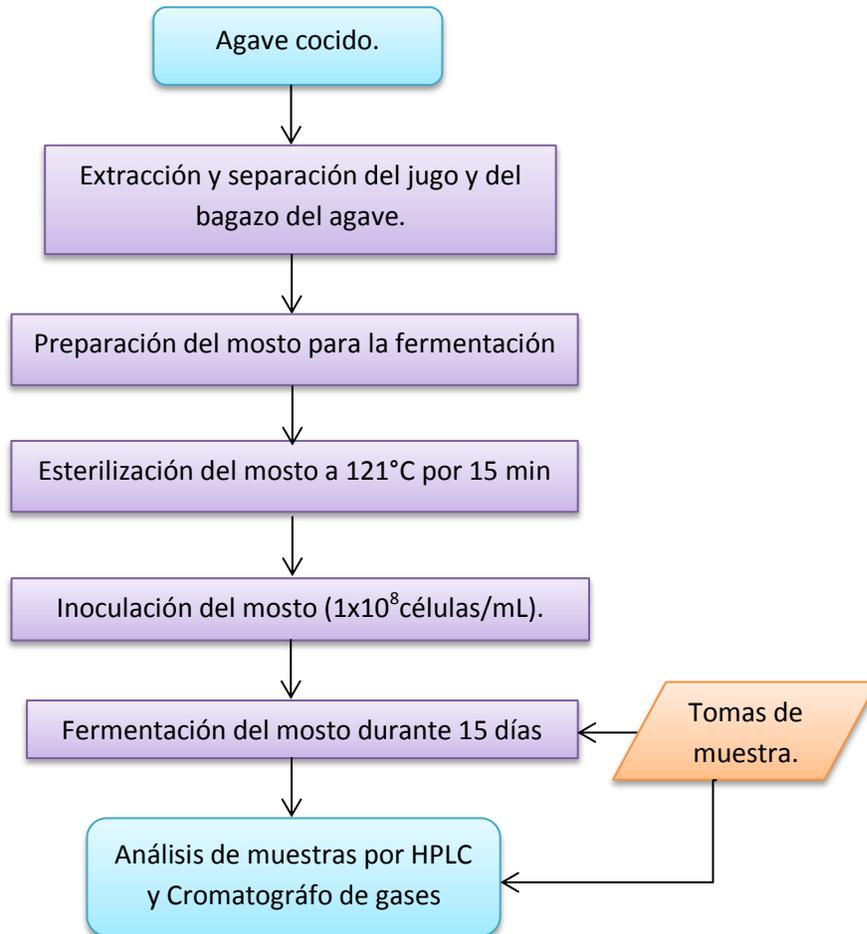


Diagrama 3.2 Estrategia general.

#### 3.2.1 Extracción del jugo de las piñas.

Las piñas con las que se trabajaron se trajeron de Oaxaca previamente cocidas en hornos tradicionales. La extracción del jugo se realizó por medio de un extractor (Turmix) recuperando el jugo en un vaso de precipitados de 1L, mientras que el bagazo se almacenó a 4°C en una bolsa (ziploc).

Se midió la concentración de sólidos solubles en el jugo (°Bx) utilizando un refractómetro (Atago, Brix 0.0 a 33.0%) y se midió el pH del mosto empleando un medidor de pH (Accumet® AB15 Basic).

### **3.2.2 Preparación del mosto para las fermentaciones.**

Se colocaron 100 g de bagazo en cada uno de los tubos de fermentación de 1L, del jugo se colocaron 250 mL en cada tubo de fermentación.

### **3.2.3 Esterilización de los tubos de fermentación.**

Los tubos preparados con el mosto para las fermentaciones se esterilizaron en una autoclave (Hirayama HA 300M) a 121°C por 15 min.

### **3.2.4 Inoculación de los tubos de fermentación.**

Las cepas empleadas como inóculo fueron aisladas previamente de palenques en la región mezcalera de Oaxaca, se agruparon por patrones de restricción del gen 26S, de las regiones D1 Y D2, amplificadas con la técnica de PCR, las cepas fueron designadas en 17 grupos y almacenadas a -80°C en caldo YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2%) con 30% de glicerol como crioprotector. Las tres cepas con las que se trabajó (DA-19, PA-16 y ZA-12) se encontraban en los grupos con mayor frecuencia de aislamiento de las fermentaciones de mezcal (Hipócrates 2011).

Se tomó con una asa bacteriológica una colonia aislada del medio de cultivo sólido YPD de cada una de las cepas se sembraron por cuadrante radial en YPD. Se tomó una colonia aislada de cada cepa y se inocularon en medio líquido YPD se incubó a 30°C durante 18h. De este cultivo se tomaron

50 µL en 20 ml de medio líquido YPD y se incubó nuevamente durante 18h a 30°C.

El conteo se realizó para saber la cantidad de células por mL que se agregó al inicio de la fermentación (aprox  $1 \times 10^8$  células/mL.). Para contar el número de células se tomaron 100 µL y se diluyeron en 900 µL de agua destilada y se tiñó con 10 µL de cristal violeta al 0.5%. Se tomaron 10µL de la muestra y se depositaron por capilaridad en una cámara de Neubauer.

El conteo en la cámara de Neubauer (Boeco, deep 1/10mm) se realizó con los cuadros marcados con números (Figura 2.1) y se calculó el total de las células de los cinco cuadros y se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo de #células /mL:

$$\#células/mL = \frac{\# \text{ Células contadas} \times \text{dilución}}{\#cuadros \text{ contados} \times 0.04 \times 0.1}$$

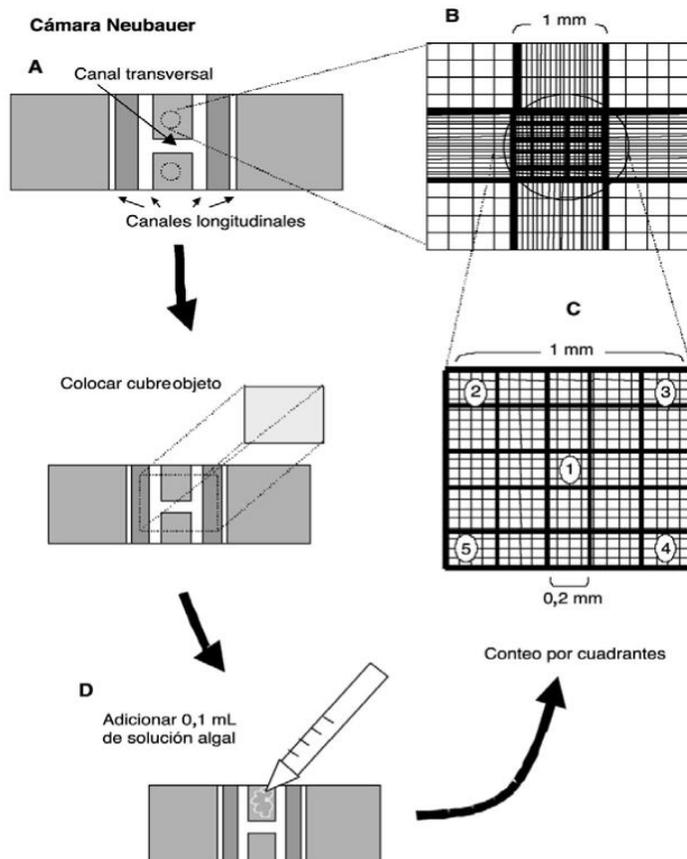


Figura 2.1 Cámara de Neubauer. (Fuente <http://2l2m-laboratoristaclinico.blogspot.mx>)

En un tubo Eppendorf se colocaron 1.5 mL del inóculo y se centrifugó a 25°C a 14000 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante para inocular los tubos de fermentación. Para el lavado del pellet formado por las levaduras en el tubo Eppendorf se resuspendió con agua destilada estéril se centrifugó a 25°C a 14000 rpm durante 5 min se retiró el sobrenadante se repitió hasta no observar turbiedad en el sobrenadante, se homogeneizó por medio de un vórtex y se inoculó el mosto de fermentación (extracto y bagazo) y se realizó para cada una de las fermentaciones.

### **3.2.5 Fermentación.**

Se llevaron a cabo un total de siete fermentaciones cada una con su duplicado, tres con cada una de las levaduras (DA-19, PA-16 y ZA-12), tres con combinaciones de las levaduras (DA-19 con PA-16, DA-19 con ZA-12 y PA-16 con ZA-12) y una donde estaban presentes las tres levaduras. Se tomaron seis muestras de cada uno de los mostos de fermentación durante 15 días, el tiempo cero corresponde a la muestra del mosto antes de inocular, las muestras se tomaron el 1°, 3°, 6°, 10° y 15° días de la fermentación. Por medio de una micropipeta se recolectaron en tubos Eppendorf estériles 3 mL del mosto. Posteriormente se midió el pH y °Bx, las muestras se almacenaron en congelación a -18°C para el análisis por cromatografía (HPLC y gases).

### **3.2.6 Análisis de azúcares y ácidos orgánicos (por medio de HPLC).**

Las muestras de los mostos de fermentación fueron descongeladas a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó con jeringas y se filtró a través de una membrana (Millipore, membrana: celulosa regenerada hidrofílica, carcasa:

PP, autoclavable, tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$  y 4 mm de diámetro). El filtrado se colocó en viales de 1mL.

El análisis de azúcares y ácidos orgánicos se realizó por medio de cromatografía de líquidos (HPLC) con una columna BIO-RAD (Aminex HPX-87H 300mm X 7.8mm), fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.004 (temperatura de 45°C, flujo isocrático de 0.6 mL/min), detector IR (Waters 2414), Inyector (Waters 2707, con un volumen de inyección de 20 $\mu\text{L}$ ), bomba (Waters 1525). Para visualizar los resultados se utilizó el programa Empower.

### **3.2.7 Análisis de etanol y compuestos volátiles.**

Los filtrados que se depositaron en los viales con la cantidad de 1mL para el análisis por HPLC, se emplearon para el análisis de etanol y compuestos congénicos volátiles por medio de cromatografía de gases en un cromatografo de gases (Agilent Technologies 6890N), columna (JW19091N-133, 260°C Max INNOWAX, capillary 30mX250 $\mu\text{m}$ X0.25 $\mu\text{m}$ , nominal), inyector (1 $\mu\text{L}$  NLets Mode Split), tanques ( $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  y aire) gas acarreador  $\text{H}_2$  (40°C, 8.06psi, flujo 77.9mL/min), detector de flama (data rate 50 Hz)

# RESULTADOS

4.1 Resultados de la identificación de las cepas

4.2 Resultados de la fermentación

*La calidad nunca es un accidente;  
siempre es el resultado de un esfuerzo de  
la inteligencia.  
(John Ruskin)*

## Resultados

### 4.1 Resultados de la identificación de las cepas.

Tabla 4.1 Tamaños de PCR y restricciones basadas en la amplificación del ITS-5.8.

CEPA	PCR (ITS-5.8S) (pbs)	<i>Hae III</i> (pbs)				<i>Hha I</i> (pbs)			<i>Hinf I</i> (pbs)	
PA-16	816.7	323.5	245.5	188	148	363.2	336.8	155.3	369.2	136.8
DA-19	489.3	221.1	192	124		226.3	176	156	386.7	
ZA-12	466.7	368	233			215.8	187	158.6	226.3	106.9

La identificación por PCR-RFLP de la región 5.8-ITS arrojó datos de las tres cepas tanto para el género como la especie, en la Tabla 4.1 podemos observar que para la cepa PA-16 el tamaño del producto de PCR fue de 816.7 pb, para las restricciones con *HaeIII*, se generaron cuatro fragmentos cuyos tamaños en par de bases (323.5+245.5+188+148), para *Hhl* se generaron tres fragmentos (363.2+336.8+155.3) y por último para *Hinfl* se generaron dos (369.2+136.8) con estos datos la cepa PA-16 se identificó como *Kluyveromyces marxianus*.

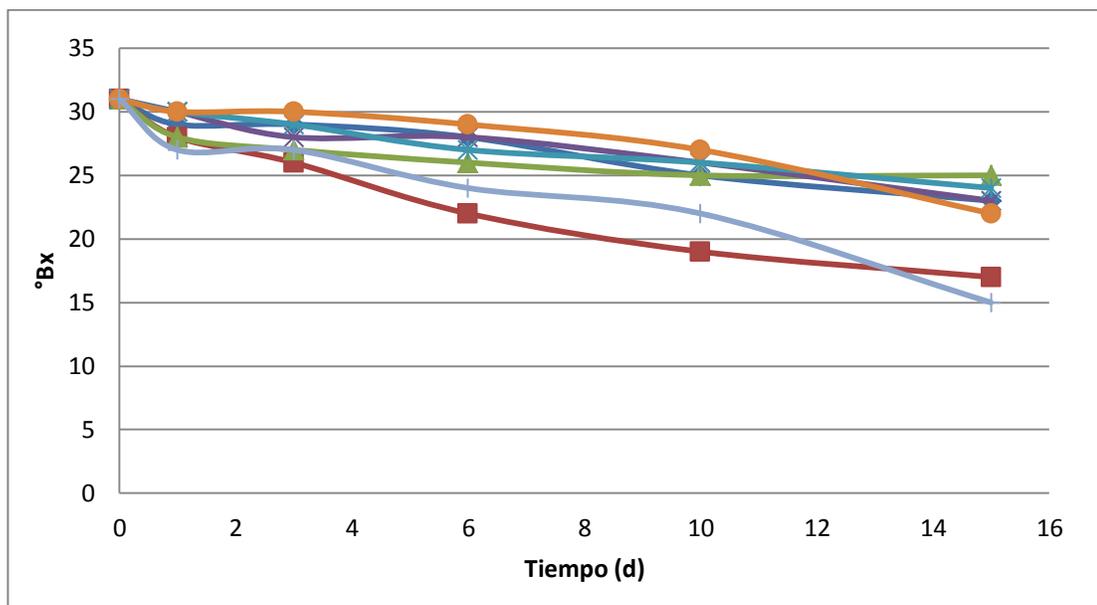
Para la cepa DA-19 se observó un tamaño del PCR de 489.3 para las restricciones en *HaeIII* se obtuvieron fragmentos de (221.1+192+124), para *Hhal* (226.3+176+156) mientras que para *Hinfl* (386.7) con estos resultados se pudo identificar a la cepa como *Pichia kudriavzevii*.

En la cepa ZA-12 se observó que el producto de PCR fue de 466.7pb, las restricciones con *HaeIII* fueron de (368+233) para *Hhal* (215.8+187+158.6) y

en *Hinfl* (226.3+106.9), y se identificó como *Pichia membranifaciens*, en artículos reportados como el de (Segura y col., 2010) el tamaño de PCR y fragmentos de restricciones realizadas por diferentes investigadores identificaron a esta levadura con valores parecidos.

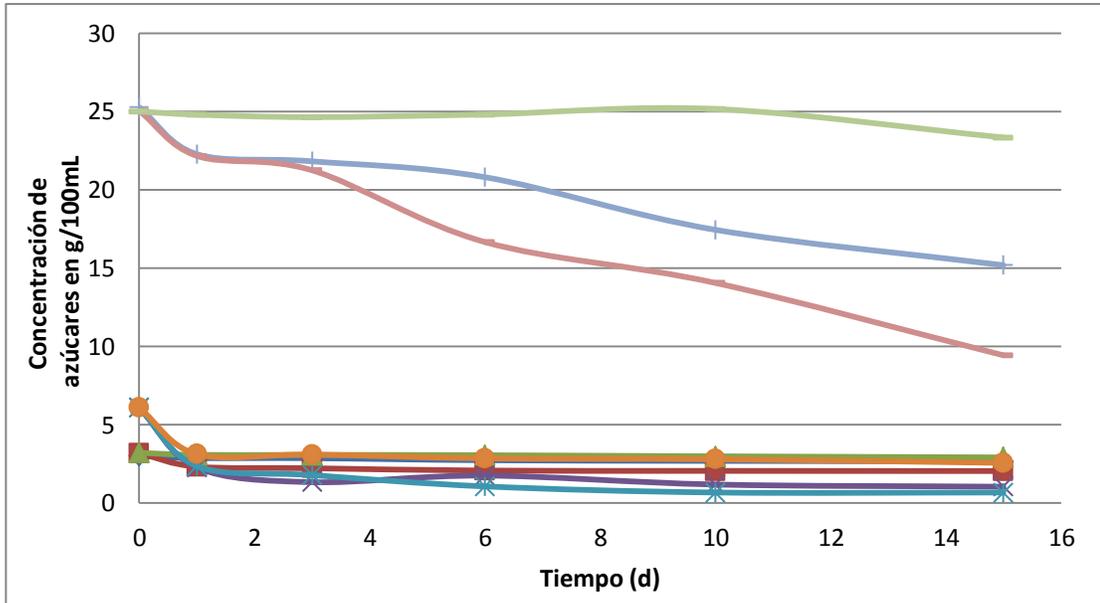
## 4.2 Resultados de la fermentación

### 4.2.1 Resultados de la fermentación de los azúcares

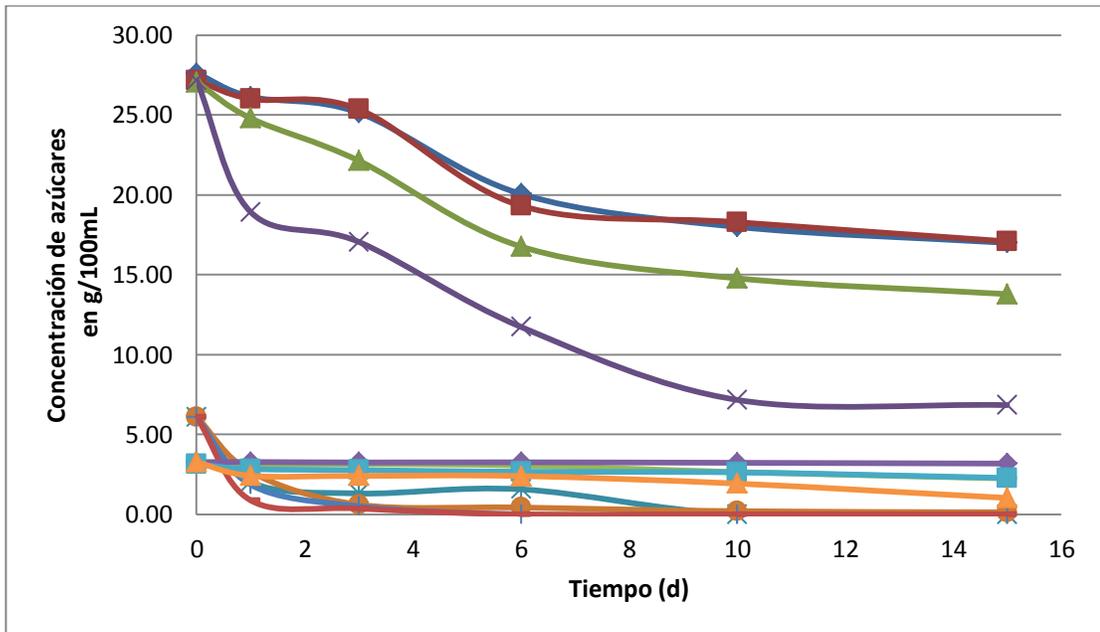


Gráfica 4.1 Reducción de los grados Brix de la fermentación de las tres cepas y sus combinaciones *Pichia kudriavzevii* — *Kluyveromyces marxianus* — *Pichia membranifaciens* — *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* — *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* — *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* — *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* — .

Los grados Brix son un parámetro que se utilizó para observar de forma rápida si la fermentación se estaba llevando a cabo ya que al ver una reducción en los °Bx indicaba que las levaduras estaban consumiendo los azúcares del mosto y por lo tanto la fermentación se estaba llevando a cabo. En la gráfica 4.1 se observa que la fermentación con *Kluyveromyces marxianus* y la combinación de las tres cepas tiene una reducción más rápida de los °Bx, mientras que el resto de las fermentaciones tienen una reducción similar.



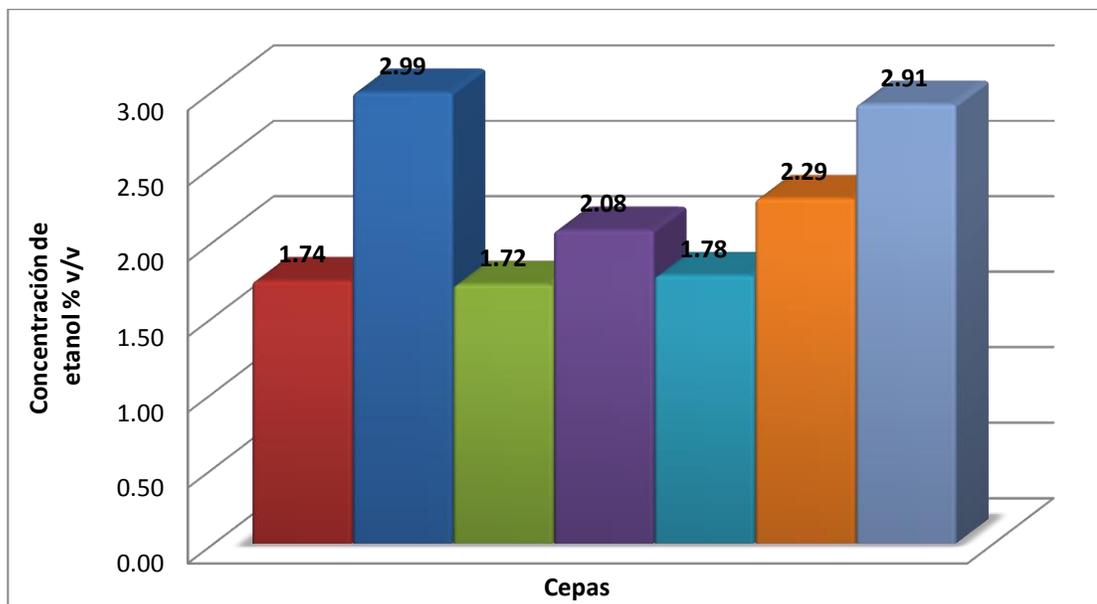
Gráfica 4.2 Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa durante 15 días de fermentación, la concentración está dada en g/100mL durante la fermentación de las tres cepas en estudio respectivamente *Pichia kudriavzevii* *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia membranifaciens*



Gráfica 4.3 Consumo de fructosa, glucosa y sacarosa durante 15 días de fermentación, concentración dada en g/100mL durante la fermentación de las combinaciones de las cepas en estudio respectivamente. *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens*

En las gráficas 4.2 y 4.3 se observa el consumo de sacarosa, glucosa y fructosa. En la gráfica 4.2 se observan las tres levaduras de forma individual y en la gráfica 4.3 se observan las combinaciones de las cepas, en ambas gráficas se puede observar que para fructosa se tiene una concentración inicial del 25% mientras que para la glucosa se tiene una concentración del 6% y para la sacarosa se tiene 3%. La diferencia de estas concentraciones se debe a que el agave está formado en mayor parte de fructanos que son polisacáridos formados por cadenas de fructosa que al hidrolizarse liberan fructosa la cual posteriormente puede ser consumida por las levaduras, en una menor proporción se tiene a la glucosa y por último a la sacarosa.

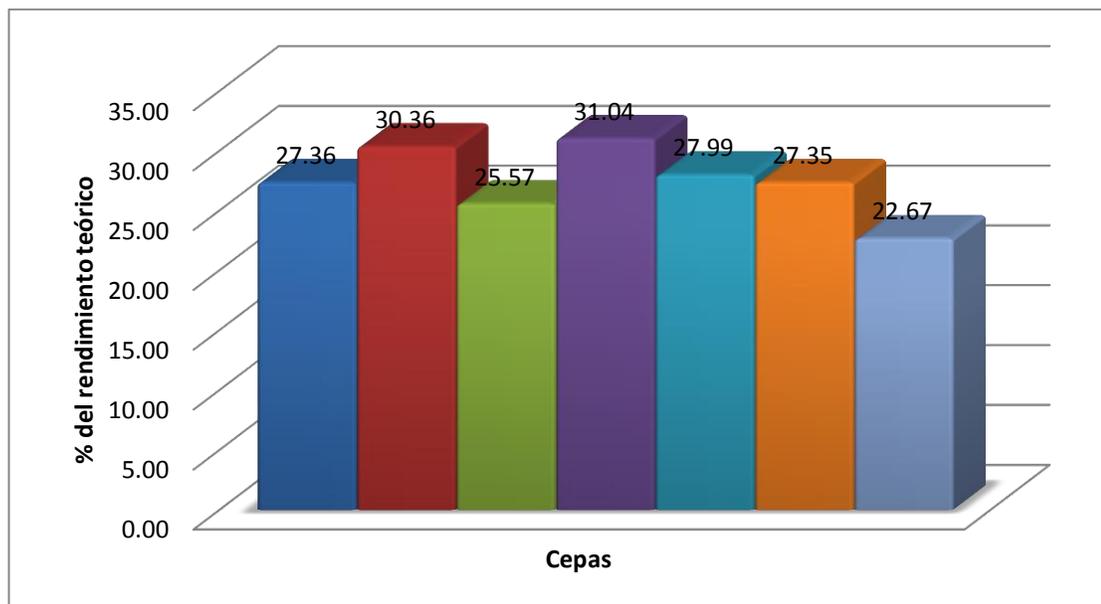
#### 4.2.2 Resultados y rendimientos en la producción de etanol.



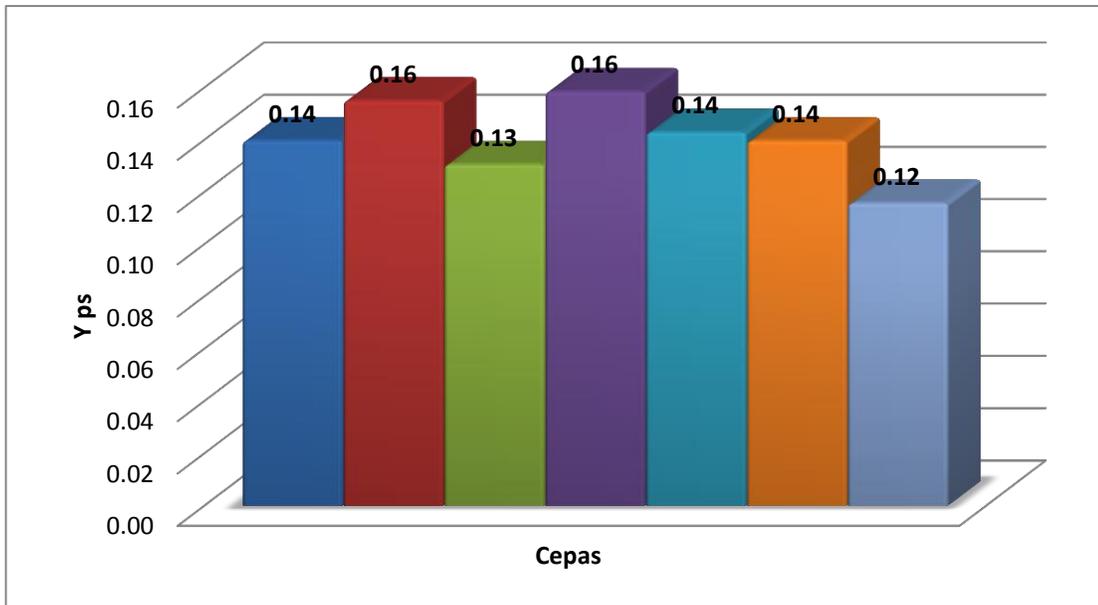
Gráfica 4.4 Producción de etanol durante 15 días, la concentración en % v/v durante la fermentación de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

En la gráfica 4.4 se puede observar que la levadura con mayor producción de etanol es *Kluyveromyces marxianus* con una concentración del 2.99%. En trabajos anteriores, (Camacho., 2009) se encontró que *Kluyveromyces marxianus* tiene una producción máxima del 3.24% y menores del 1%.

La combinación que tuvo mayor producción fue la combinación de las tres cepas con una concentración del 2.91% ya que las tres levaduras están consumiendo azúcar y produciendo etanol simultáneamente. En las combinaciones donde está presente *Kluyveromyces marxianus* la concentración de etanol es mayor con un 2.19% y un 2.29% a diferencia de la combinación donde no está presente donde hay 1.78% de etanol producido y se puede observar que la cepa por sí sola es la que tiene mayor producción de etanol.



Gráfica 4.5 Rendimientos teóricos en la producción de etanol de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .



Gráfica 4.6 Rendimientos reales de la producción de etanol de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

En la gráfica 4.5 se muestra el porcentaje del rendimiento teórico en la producción de etanol de las tres cepas y sus combinaciones, en esta gráfica se puede observar que la cepa con mayor rendimiento teórico es *K. marxianus* con un 30.36%, seguido por *P. kudriavzevii* con el 27.36% y la cepa con un menor rendimiento teórico fue *P. membranifaciens* de las combinaciones la que tuvo un rendimiento mayor fue *P. kudriavzevii* con *K. marxianus* con un 31.04%, seguido por *P. kudriavzevii* con *P. membranifaciens* con 27.99%, después *K. marxianus* con *P. membranifaciens* con el 27.35% y por último la combinación de las tres cepas *P. kudriavzevii* con *K. marxianus* y con *P. membranifaciens* con el 22.67%.

Cabe notar que tanto en la producción de etanol como en los rendimientos teóricos de nuevo se observa que *K. marxianus* tiene el rendimiento teórico más alto y una de las combinaciones en la que está presente también tiene el rendimiento más alto.

En la gráfica 4.6 se muestra el rendimiento real en gramos de etanol producido/gramos de azúcares consumidos por las levaduras en estudio y sus combinaciones.

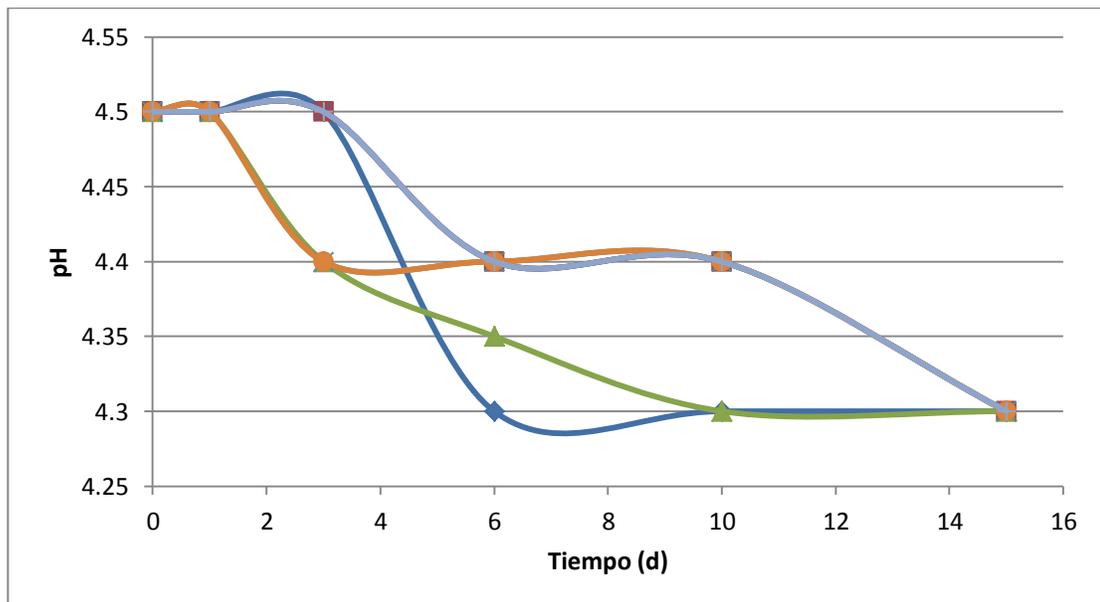
Como se había observado en el gráfico 4.4 y 4.5 *K. marxianus* es la levadura con mayor producción de etanol y con un mayor rendimiento teórico y como se puede observar en la gráfica 4.6 efectivamente se comprueba que *K. marxianus* de las tres levaduras en estudio es la que produce una mayor cantidad de etanol con un rendimiento real del 0.16% otros resultados reportados en los que se ha trabajado con *K. marxianus* (Camacho., 2009) se reportan rendimientos reales del 0.17%, rendimientos que no están fuera de lo normal ya que se sabe que está levadura no produce una elevada cantidad de etanol como es el caso de *S. cerevisiae*.

La combinación de *P. kudriavzevii* con *K. marxianus* muestra un rendimiento real también del 0.16%, y como se observó en las gráficas 4.4 y 4.5 es la combinación con una mayor producción de etanol.

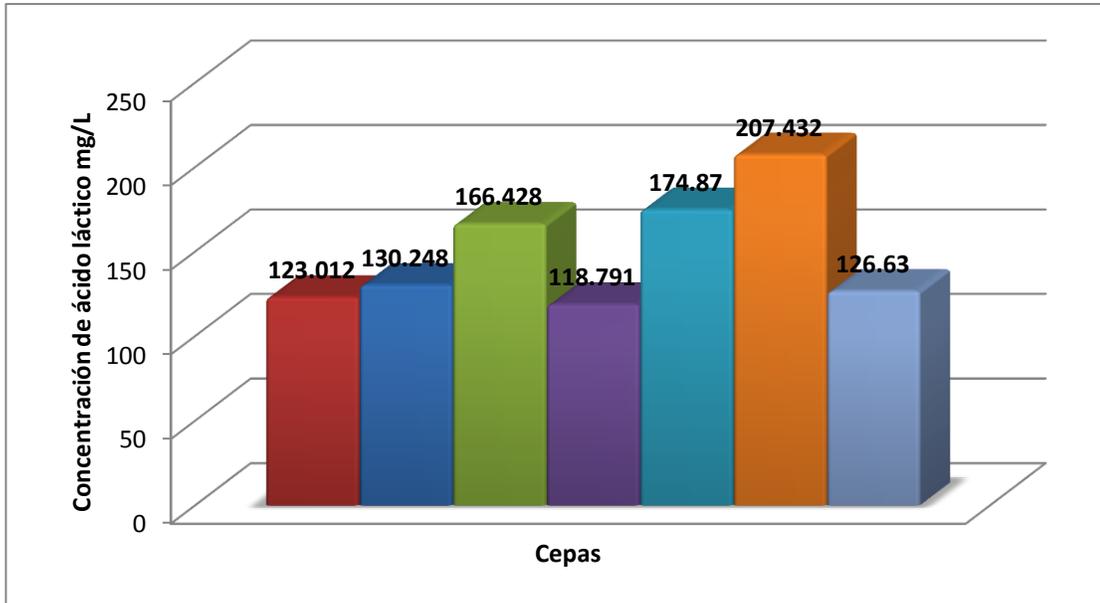
Algo que se observa en la gráfica 4.4 es la producción de etanol para la combinación donde están las tres cepas tiene una producción del 2.91% es la que tiene una mayor producción de etanol después de *K. marxianus*, pero si observamos el gráfico 4.6 podemos ver que su rendimiento real es el más bajo.

#### 4.2.3 Resultados de las concentraciones de compuestos congénéricos de ácidos orgánicos.

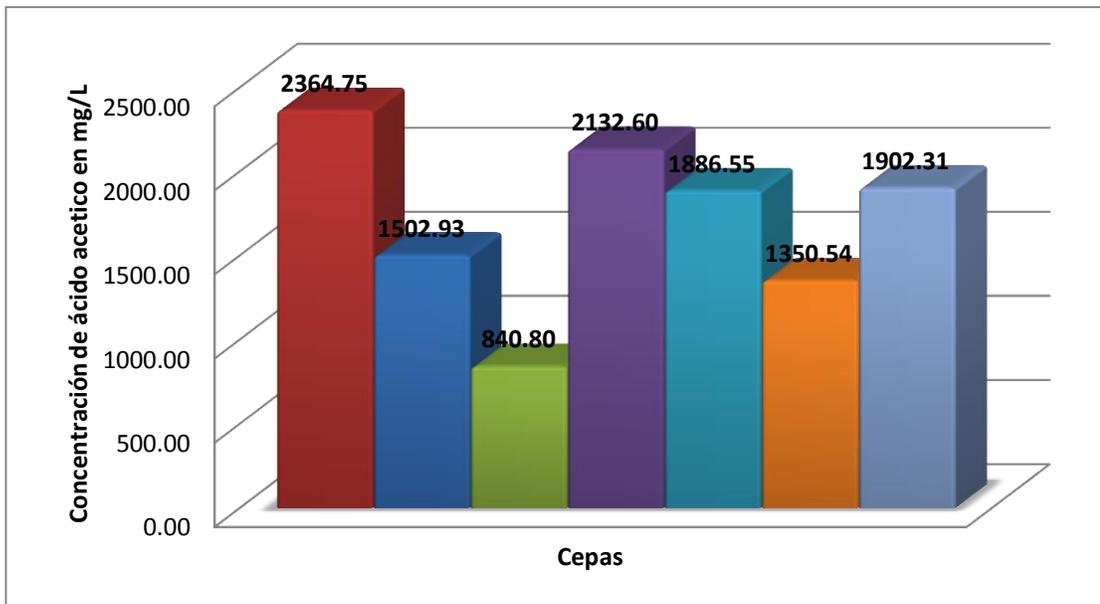
Generalmente las levaduras responsables del proceso de fermentación metabolizan los azúcares en un medio ácido. A pH por debajo de 3, la actividad de las levaduras disminuye ocasionando la aparición de sulfuros libres. El intervalo óptimo para el crecimiento de las levaduras se encuentran entre pH 4 y pH 6 (Usseglio, 1998), en la gráfica 4.7 se muestra la reducción del pH, el mosto inicialmente tenía un pH de 4.5 y todas las fermentaciones terminaron con un pH de 4.3, lo cual nos indicó que el medio fermentativo estaba en el rango óptimo de pH para el crecimiento de las levaduras por lo cual se pudo realizar una fermentación adecuada sin la aparición de sulfuros que pudieran generar sabores y olores desagradables en la fermentación.



Gráfica 4.7 Donde se muestra la reducción del pH durante 15 días, de las tres cepas y sus combinaciones en estudio, *Pichia kudriavzevii* — *Kluyveromyces marxianus* — *Pichia membranifaciens* — *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* — *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* — *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* — *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* .



Gráfica 4.8 Producción de ácido láctico en un lapso de 15 días de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

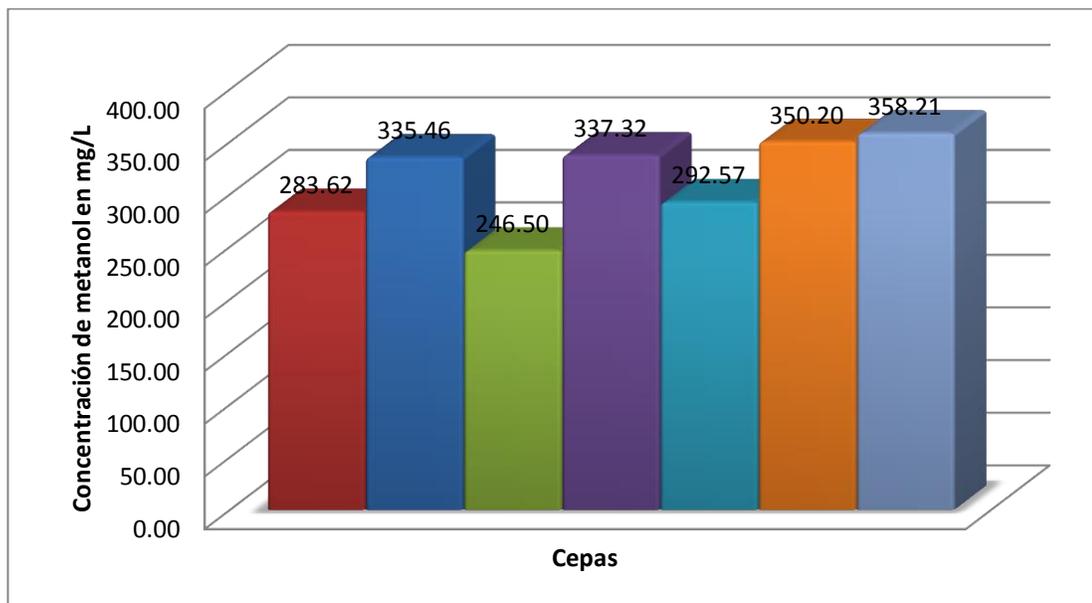


Gráfica 4.9 Producción de ácido acético en un lapso de 15 días, la concentración en mg/L de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

En la gráfica 4.8 se observa la producción del ácido láctico en un lapso de 15 días, también se muestra que la cepa con mayor producción de ácido láctico es *P. membranifaciens* con una concentración de 166.428 mg/L y las combinaciones donde está presente esta levadura se observan las mayores producciones de ácido láctico. En la gráfica 4.9 se puede observar la producción de ácido acético, la cepa que produce más ácido acético es *P. kudriavzevii* con una concentración de 2364.75 mg/L, la que tiene una menor producción de este ácido es *P. membranifaciens*, las combinaciones en las cuales se produjo más ácido acético estaba presente *P. kudriavzevii*, por lo cual se podrían emplear estas dos levaduras en la elaboración de mezcales con perfiles de sabor ácido o no emplearlas si lo que se requiere es de un mezcal con sabores menos ácidos.

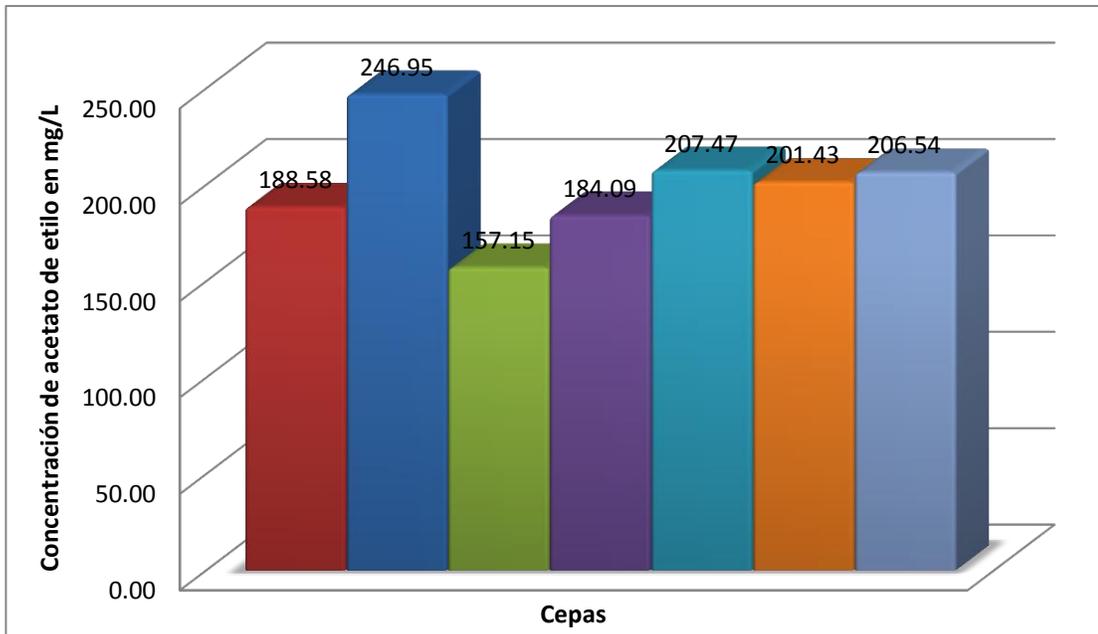
Además de la actividad metabólica de las levaduras en la fermentación existen otros factores que influyen en la producción de ácido acético durante la fermentación alcohólica, destacando entre éstos la anaerobiosis, algunas carencias de vitaminas y aminoácidos, las temperaturas de fermentación elevadas durante la fase de multiplicación celular (25° a 30° C), y el pH (Hidalgo., 2002).

#### 4.2.4 Resultados de compuestos congénicos volátiles.



Gráfica 4.10 Cantidad de metanol observado después de 15 días de fermentación en mostos de *Agave angustifolia*, producido en la fermentación con *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

El alcohol metílico existe en el mezcal en proporciones variadas, se forma durante la fermentación pero sin relación alguna con ella, por hidrólisis de las pectinas (pectinas solubles y protopectinas) del *Agave*. Como se puede observar en la gráfica 4.10 las proporciones del metanol son variadas, es importante observar que esta concentración de metanol no afecte en el producto final ya que la NOM-070-SCFI-1994 permite un máximo de 300 mg/100 mL, y como ya se mencionó que la producción de metanol no depende de la fermentación no importaría que combinación o levadura se ocupe para la producción de metanol ya que no es como tal un producto de la fermentación alcohólica.



Gráfica 4.11 Producción de acetato de etilo en un lapso de 15 días, la concentración en mg/L de las cepas en estudio *Pichia kudriavzevii* ■ *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Pichia membranifaciens* ■ *Kluyveromyces marxianus* con *Pichia membranifaciens* ■ *Pichia kudriavzevii* con *Kluyveromyces marxianus* y con *Pichia membranifaciens* ■ .

En la gráfica 4.11 se observa la producción del acetato de etilo, la mayor producción se observó cuando se empleó *K. marxianus* en la fermentación si *K. marxianus* es la cepa que más produce acetato de etilo se podría utilizar en una fermentación controlada para dar perfiles de sabor afrutados si es lo que se quiere en el mezcal, si lo que se desea es un sabor menos afrutado se podría ocupar *P. kudriavzevii* ya que fue la cepa con menor concentración de acetato de etilo

Los ésteres son producidos intracelularmente como resultado de la condensación de ésteres de Coenzima A de ácidos grasos con alcoholes. Una vez formados y siendo liposolubles, difunden de las células de levaduras al caldo de fermentación. La reacción es catalizada por una alcohol aciltransferasa.

Las razones por las que la célula de levadura forma ésteres no es todavía completamente clara, puede ser una forma de desechar productos del metabolismo de azúcares durante la fermentación o se puede considerar como un mecanismo de desintoxicación, ya que se sabe que los ácidos grasos de cadena mediana (entre C8 y C14) son tóxicos para la levadura, especialmente si son insaturados. Se sabe que la limitación en algunos elementos traza tiene influencia en la concentración de acetato de etilo (Delgado, 2013).

El perfil de ésteres y sus concentraciones dependen de la cepa de levadura empleada y el tipo de *Agave*. El acetato de etilo está relacionado con sabores frutales. Diferentes temperaturas de fermentación generan diferentes perfiles, especialmente la formación de acetato de etilo que está favorecido por un aumento de la temperatura (Santillán y García, 1998).

# CONCLUSIONES Y TRABAJOS A FUTURO

Conclusiones

Trabajos a futuro

*Todo lo que somos es el resultado de lo que  
hemos pensado; está fundado en nuestros  
pensamientos y está hecho de nuestros  
pensamientos.  
(Buda)*

## Conclusiones.

Obteniendo los patrones de restricción de las enzimas *HaeIII*, *HinfI* y *HhaI* del los fragmentos amplificados de la región ITS-RNAr 5.8S de las tres cepas aisladas, con estos patrones se identificaron a:

- 1) DA-19 como *Pichia kudriavzevii*.
- 2) PA-16 como *Kluyveromyces marxianus*.
- 3) ZA-12 como *Pichia membranifaciens*.

Si la fermentación requiere que se lleve en el menor tiempo de fermentación se podría utilizar a *K. marxianus* reduciendo tiempos de producción y reduciendo costos en la producción de mezcal.

Para obtener una producción mayor de etanol en menor tiempo se podría utilizar *K. marxianus* en el proceso de elaboración de mezcal.

*P. membranifaciens* es la que produce una mayor cantidad de ácido láctico mientras que *P. kudriavzevii* y *K. marxianus* lo producen en una cantidad menor.

Para la producción de ácido láctico y acético dependerá del perfil que se quiera lograr en el mezcal y tomando en cuenta que para la producción de estos ácidos participan bacterias lácticas y acéticas pero también se tiene que tomar en cuenta la participación de las levaduras que generen estos compuestos.

Para el metanol hay que tener en cuenta que en producto terminado no rebase los parámetros que indica la NOM-070-SCFI-1994.

Para sabores afrutados se puede utilizar a *K. marxianus* ya que fue la cepa que produjo una mayor cantidad de acetato de etilo.

Con la metodología por cromatografía de líquidos y gases se observó que la determinación de compuestos congénicos encontrados en los mostos de fermentación con las levaduras individuales y en combinación fueron los mismos pero con concentraciones diferentes, para encontrar más compuestos se necesita ocupar más estándares de compuestos congénicos que podrían estar presentes en el mosto de fermentación u ocupar una metodología más sensible como una microextracción en fase sólida.

### **Trabajo a futuro.**

- Para la continuidad de este proyecto es necesario que después de la fermentación se realice una destilación, ésta no se realizó pero como trabajo a futuro se podría realizar para saber los compuestos congenéricos que están presentes en el destilado.
- Otro punto importante es seguir identificando las levaduras que están presentes en los mostos de mezcal e identificar los compuestos congenéricos que éstas producen para observar si se generan diferentes perfiles sensoriales en el mezcal dependiendo de las levaduras que se empleen en mostos de fermentación.
- Con respecto a los microorganismos no se pueden dejar pasar las bacterias y para poder completar este trabajo sería interesante que también se estudiaran las bacterias lácticas y acéticas presentes en la elaboración del mezcal.

Tomando en cuenta estos puntos creo que esta investigación permitirá conocer más sobre la ecología microbiana del mezcal.

## Bibliografía:

- Andrade O E, 2006. *Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la región de Sola De Vega Oaxaca*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM.
- Astromoff A, 2000. *Saccharomyces cerevisiae: Genetics and Genomics*. In Manual of Industrial Microbiology and Bitechology, Demain Arnold L. (ed), 2th edition, ASM Press, pp 435-446
- Baleiras C M M, Reizinho R G, Duarte F L, 2005. *Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeast present during red wine fermentations*. International Journal of Food Microbiology, 102, pp 49-56.
- Blomberg L, 2000. *Tequila, Mezcal y Pulque, México*, Ed. Diana.
- Camacho B A, 2009. *Evaluación de la producción de etanol por Kluyveromyces marxianus en mostos de Agave Tequilana Weber*. Tesis de licenciatura en Químico de alimentos. UNAM.
- Cedeño C M, 1995. *Tequila Production*. Critic Rev. Biotech, pp 151.
- Cole V C, Noble A C, 2003. *Flavor chemistry. In: Fermented Beverage Production*. A G H Lea, J R Piggott (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers New York. pp: 393-396.
- Collado Q. *Levaduras y la fermentación alcohólica (II)*. 2001. [en línea].<http://www.verema.com/articulos/500449-levaduras-y-lafermentacionalcoholica-ii>>. (Consulta: 7 de noviembre 2012).

- Cova P C, 2010. *Caracterización molecular de las cepas de Saccharomyces cerevisiae, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila*. Tesis de licenciatura en Químico de alimentos. UNAM.
- De León R A, González-H A, Barba de la R P, Escalante M, López M G, 2006. *Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave salmiana*. J. Agric. Food Chem. 54, pp 1337-1341.
- Delgado A, 2013. *Performance evaluation of Pichia kluyveri, Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae in industrial tequila fermentation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Volume 29, Issue 5, pp 875-881.
- Dlauchy D, Tornai L J, Gárbon P, 1999. *Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification*. Systematic and Applied Microbiology, 22, pp 445-453.
- Escalante M P, Barba L, De León R A, 2012. *Aspectos Químicos y Moleculares del Proceso de Producción del Mezcal*. BioTecnología, Año 2012, Vol. 16 No. 1, pp 57-70.
- Escalante M P & Ibarra-J, 2007. *Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas*. Revista SMBB 11, pp 28-36.
- Esteve Z B, Belloch C, Uruburu F, Quero, 1999. *Identification of yeast by RFLP of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal*. International Journal of Systematic Cacteriology, 49 (1999): 329-337.

- Fernández E M, Martorrel P, De Llanos R, Querol A, 2006. *Molecular Methods to identify and characterize yeast in food and Beverages*. Vol. 2 en. The yeast handbook vol.2 Yeast in food and beverages, pp 56-82.
- García M A, 2007. *Los agaves de México*. Jardín botánico. Instituto de biología, Universidad Autónoma de México, Ciencias.
- Gil H A, 2010. *Tratado de nutrición*. Editorial médica panamericana, pp. 293-294.
- González H L, 2005. *Análisis cromatográfico del mezcal*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, pp. 1-81.
- Hidalgo T J, 2002. *Tratado de enología*. Editorial Aedos, pp. 500-5008.
- Lachenmeier D W, E M Sohnius, R Attig, M G López, 2006. *Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican Agave spirits (tequila, mezcal, sotol and bacanora)*. J. Agric. Food Chem. 54:3911-3915.
- Lappe P, 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, 2008, pp 1037-1052.

- López M G, 1999. *Tequila Aroma. In: Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. F Shahidi, Ch Ho (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp: 211-217.
- Luna Z R, 1991. *La historia del Tequila de sus regiones y sus hombres*. 2 ed, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes.
- Mancilla-M & Lopez M G, 2006. *Watersoluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species*. J. Agric. Food Chem. 54, pp 7832-7839.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas Alcohólicas Tequila-Especificaciones.
- Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas Alcohólicas. Mezcal. Especificaciones.
- Orberá R T, 2004. *Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico*. Rev Iberoam Micol, pp 21: 15-19.
- Peña A A, Díaz L, Medina L C, Capella S & Vera L E, 2004. *Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase-gas chromatography-mass spectrometry*. Journal Chromatography A 1027 pp 131-136.
- Pinal L, Cedeño M, Gutiérrez H, Álvarez J, 1997. *Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process*. Biotechnol. Lett. 19, 45-47.
- Riu A M, 2005. *Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta*. Tesis de grado de Doctor en Ciencias, Universidad de Barcelona, España.

- Rodríguez G J A, Lomelí S E, Tapia C A, Gutiérrez M J, García G J M, Rodríguez D D, Urbina L I, Vicente R, 2009. *Industrial Crops and Products*, Volume 29, pp 220-228.
- Rossen L, Norskov P, Holmstron K, 1992. *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solution*. *International Journal of Food Microbiology*, pp 17, 37-47.
- Ruiz H M & Martínez G M, 1997. *Curso popular de cata de vinos*. Edita, Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, España.
- Santillan V M Del C y García G M, 1998. *Biosíntesis de Congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol.40, No. 1 y 2, pp 114-115.
- Secretaria de Economía, México, 2008.
- Segura G L E, 2010. *PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas*. *e-Gnosis*, Vol. 8, pp.1-12, Universidad de Guadalajara México.
- Torija M J, 2002. *Ecología de levaduras selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Tesis de doctorado. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología.

- Tortora G J y otros, (2007). *Introducción a la microbiología*. Editorial médica panamericana, pp 134-137.
- Usseglio T Se I, 1998. *Química Enológica*. Ediciones Mundi-Prensa. España, pp 127.
- Vera G A, Santiago G, Patricia A, López M G, 2009. *Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de agave angustifolia y agave potatorum*. Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. 32, Núm. 4, octubre-diciembre, 2009, pp 273-279.

### Referencias.

- Hipócrates, 2011. Proyecto de maestría, UNAM.
- <http://www.torontohispano.com/entretenimiento/mexico/2011/tequila/show.shtml>. Recuperado el 7 de noviembre.
- <http://www.sexenio.com.mx/puebla/articulo.php?id=8654>. Recuperado el 7 de noviembre.
- <http://vinoskupel.blogspot.mx/2009/02/ls-levaduras-fermentativas.html>. Recuperado el 7 de noviembre.
- <http://www.formulamexicana.com/?p=1995>. Recuperado el 7 de noviembre.
- <http://uniradioinforma.com/noticias/graficosespeciales/articulo100960.html>. Recuperado el 7 de noviembre.

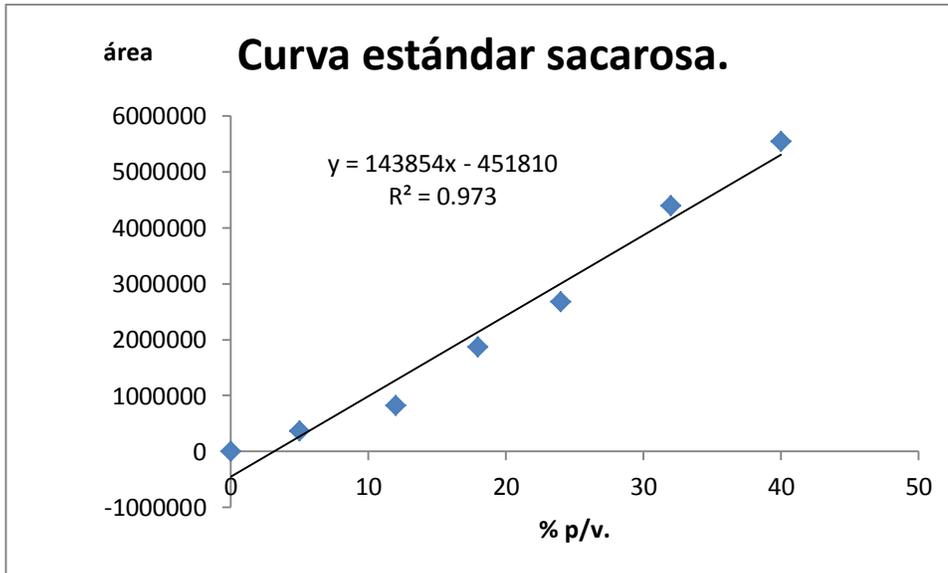
- <http://2l2m-laboratoristaclinico.blogspot.mx/2009/04/camara-de-neubauer.html>. Recuperado el 7 de noviembre.
- <http://sigloveinte.com.mx/?p=2780>. Recuperado el 7 de noviembre

## ANEXO A

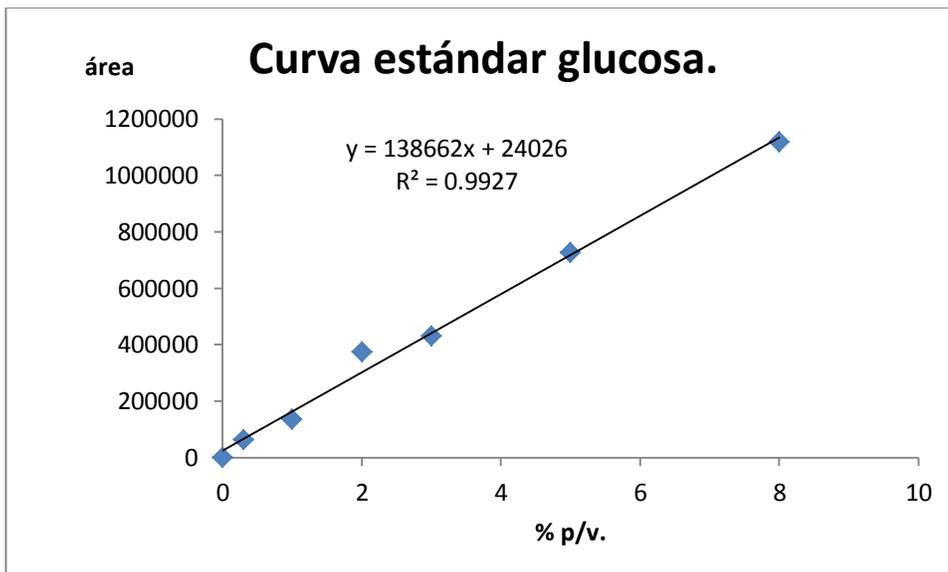
Curvas patrón empleadas para la determinación de azúcares, etanol y compuestos congénéricos.

*Las puertas de la sabiduría  
nunca están cerradas  
(Benjamín Franklin)*

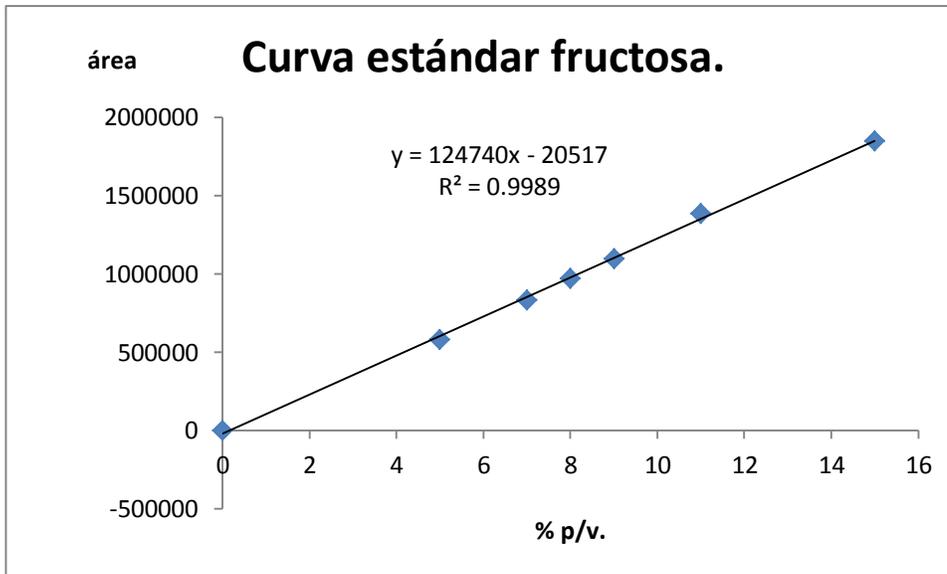
**Anexo A. Curvas patrón empleadas para la determinación de azúcares, etanol y compuestos congénicos.**



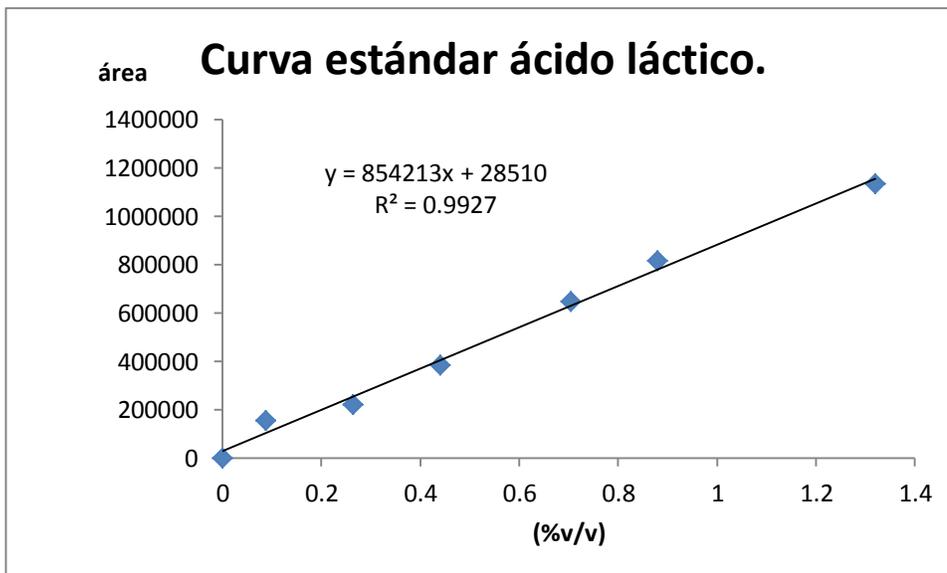
Gráfica 12B Muestra las concentraciones porcentuales de sacarosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.



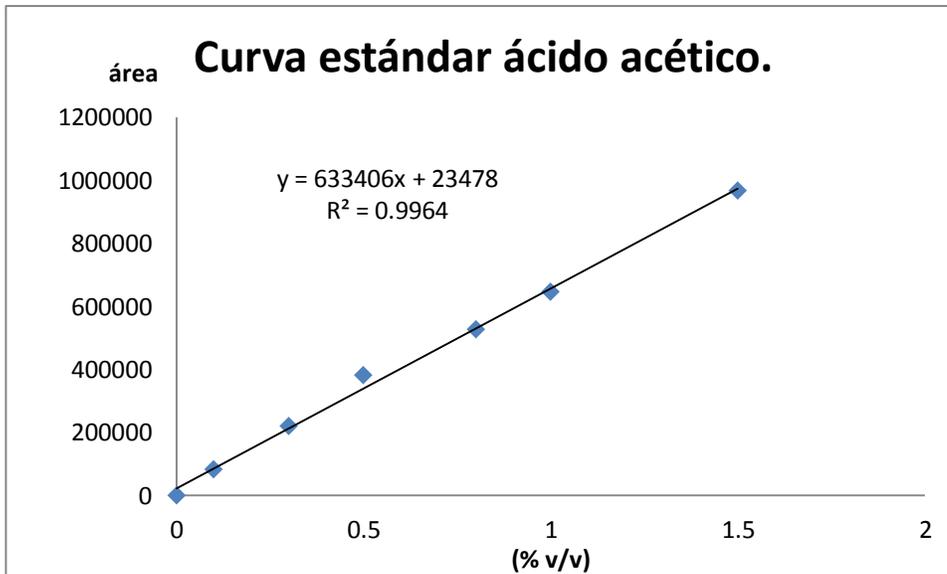
Gráfica 13B Muestra las concentraciones porcentuales de glucosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.



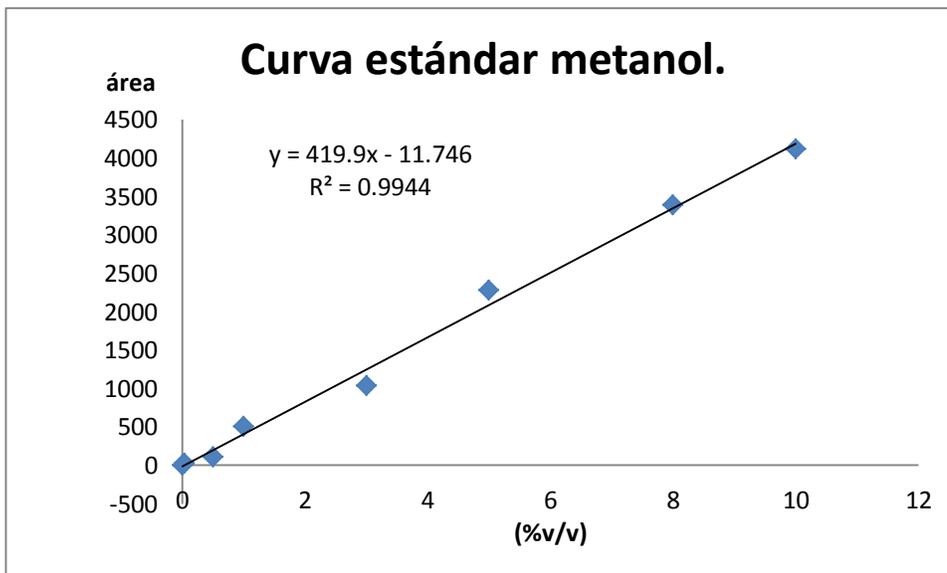
Gráfica 14B Muestra las concentraciones porcentuales de fructosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.



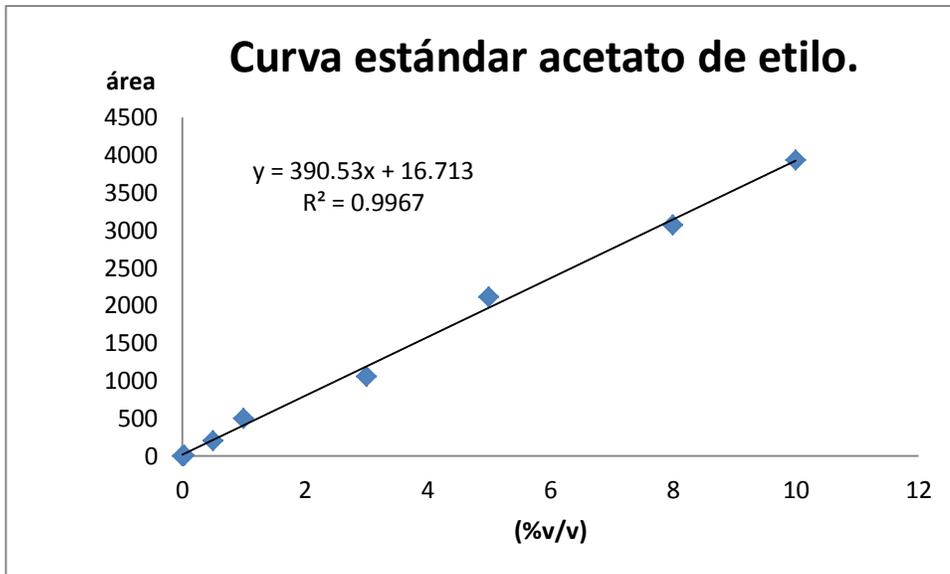
Gráfica 15B Muestra las concentraciones porcentuales de ácido láctico vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.



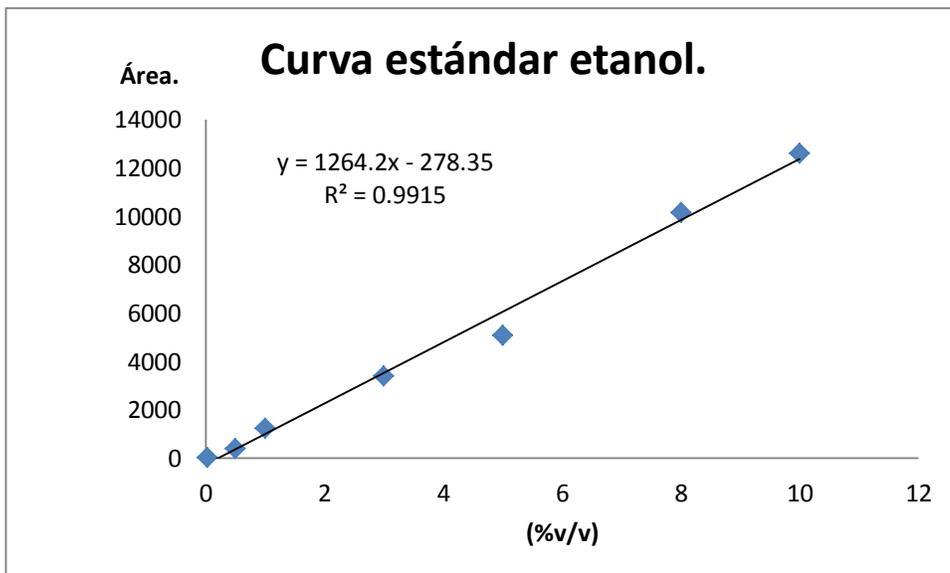
Gráfica 16B Muestra las concentraciones porcentuales de ácido acético vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta.



Gráfica 17B Muestra las concentraciones porcentuales de metanol vs área del pico de un cromatograma de gases y la ecuación de la recta.



Gráfica 18B Muestra las concentraciones porcentuales de acetato de etilo vs área del pico de un cromatograma de gases y la ecuación de la recta.



Gráfica 19B Muestra las concentraciones porcentuales de etanol vs área del pico de un cromatograma de gases y la ecuación de la recta.