



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES
COMPUESTOS VOLÁTILES PRODUCIDOS
POR 4 CEPAS DE *S. cerevisiae*, AISLADAS
DEL MEZCAL, EN JUGO DE *Agave
angustifolia* Y EN MEDIO SINTÉTICO**

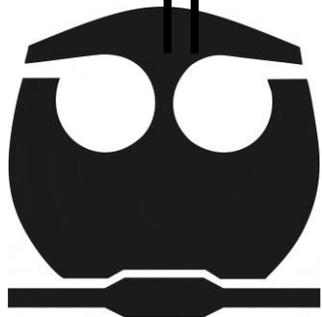
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SARA YTALIVY GEYER DE LA MERCED



México D.F.

2015



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: Q.F.B. MARÍA ELENA CAÑIZO SUÁREZ

VOCAL: DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

SECRETARIO: DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN

1er. SUPLENTE: M. EN C. NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: DRA. HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321, CONJUNTO E

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO RUIZ TERÁN

SUPERVISOR TÉCNICO:

HILDA ELIZABETH CALDERON VILLAGOMEZ

SUSTENTANTE (S):

SARA YTALIVY GEYER DE LA MERCED

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
Alimentos y bebidas fermentadas	4
Mezcal	5
Denominación de origen del mezcal	6
Regiones productoras de agave y mezcal en Oaxaca	7
Proceso de elaboración de mezcal	8
Cocimiento	9
Molienda.....	11
Fermentación	11
Destilación.....	11
Envasado	12
Levaduras	13
Requerimientos nutricionales de las levaduras	14
Metabolismo	15
Vías metabólicas de las levaduras: Glucólisis y fermentación	16
Ácidos orgánicos formados en la fermentación	19
Compuestos volátiles en el agave.	19
Compuestos volátiles producidos durante la fermentación	19
Factores que afectan en la producción de alcoholes superiores.	23
Método instrumental: Cromatografía y microextracción en fase sólida	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
METODOLOGÍA	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Cepas de levaduras	27
Preparación de los medios de cultivo	27
Medio de cultivo sintético.....	27
Medio natural: mosto de <i>A. angustifolia</i>	28
Preparación de inóculos	28
Condiciones de fermentación	29
Muestreo y monitoreo de las fermentaciones	30
Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)	31
Determinación de pH de medios de cultivo durante la fermentación	31
Determinación de concentración celular	31

Determinación de azúcares.....	31
Determinación de ácidos orgánicos.....	31
Determinación de compuestos volátiles.....	32
Análisis estadísticos	33
Rendimientos	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
Consumo de azúcares y crecimiento celular.....	35
Producción de ácidos orgánicos.....	42
Producción de compuestos volátiles.....	42
Rendimientos.....	49
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
ANEXOS.....	54
ANEXO 1. Composición del medio sintético (Segura–García, 2014).....	54
ANEXO 2. Tiempos de retención de los compuestos volátiles y ácido orgánico y curvas de calibración fructosa, ácido láctico, acetato de etilo y alcoholes.....	54
ANEXO 3. Cálculos de porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$), productividad y rendimiento de formación de producto.....	57
BIBLIOGRAFÍA	59

Índice de figuras

Figura 1. Estados con Denominación de Origen del Mezcal. Durango (1), Zacatecas (2), Tamaulipas (3), San Luis Potosí (4), Guanajuato (5), Guerrero (6) y Oaxaca (7). Fuente: (Comité Nacional Sistema Producto Maguey Mezcal, 2011).....	6
Figura 2. Regiones del Estado de Oaxaca. Fuente: (Sistema de Información Básica Municipal del Estado de Oaxaca, 2010).....	7
Figura 3. Distritos del Estado de Oaxaca. Fuente: (Sistema de Información Básica Municipal del Estado de Oaxaca, 2010).	8
Figura 4. Formación de furfurales. La hidrólisis acida a temperaturas altas de monosacáridos, sufren deshidratación que conduce a la formación de un anillo pentagonal de furfural o hidrometilfurfural, según se parta de pentosa o hexosa.....	10
Figura 5. Estructura química de la polifruktosa	10
Figura 6. Tipos de metabolismo. Relación energética entre catabolismo y anabolismo, donde las rutas catabólicas suministran energía química en forma de ATP, NADH, NADPH y FADH ₂) que es utilizada en las rutas anabólicas para convertir moléculas precursoras pequeñas en macromoléculas. Fuente de Compendio de bioquímica, Facultad de Química.	16
Figura 7. Fermentación alcohólica: degradación de azúcares por las levaduras (Suárez, 2004).....	18
Figura 8. Alcoholes superiores (fusel) producidos por el metabolismo de las levaduras por dos rutas donde utilizan alfa-cetoácido.	21
Figura 9. Síntesis de alcoholes superiores a partir de los aminoácidos y de los ácidos cetónicos. 1 reacción de transaminación 2: reacción de descarboxilación 3: reacción de deshidrogenación.....	22

Figura 10. Esquema de la relación entre aminoácidos, ácidos cetónicos, alcoholes superiores y ésteres.	23
--	----

Figura 11. Sistema de fermentación: a) fermentación en medio de cultivo sintético y b) fermentación en mosto de agave.	29
--	----

Índice de tablas

Tabla 1. Lugar de procedencia de las cepas de levaduras.	27
--	----

Tabla 2. Diseño experimental factorial 2^3 para la determinación de los principales compuestos volátiles	30
---	----

Tabla 3. Concentraciones iniciales de azúcares (g/L) y etanol (%v/v) en medio sintético y en mosto de <i>Agave angustifolia</i>	34
---	----

Tabla 4. Concentración de los principales compuestos volátiles y un ácido orgánico en el último día de fermentación.	43
--	----

Tabla 5. Porcentajes de consumo de fructosa, $Y_{p/s}$, productividad y rendimiento en las fermentaciones.	50
---	----

Índice de gráficas

Gráfica 1. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de <i>A. angustifolia</i> (b) empleando la cepa CH-7. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.	38
Gráfica 2. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de <i>A. angustifolia</i> (b) empleando la cepa DI-14. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.	39
Gráfica 3. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de <i>A. angustifolia</i> (b) empleando la cepa PA-16. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.	40
Gráfica 4. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de <i>A. angustifolia</i> (b) empleando la cepa PA-18. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.	41
Gráfica 5. Concentración de alcoholes superiores, suma de alcoholes: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.	48
Gráfica 6. Curva patrón de fructosa por patrón externo.	56
Gráfica 7. Curva patrón de ácido láctico por patrón externo.	56
Gráfica 8. Curva patrón de acetato de etilo y de alcoholes superiores por patrón externo.	55
Gráfica 9. Curva patrón de etanol por patrón externo.	55

RESUMEN

En este estudio se determinaron los principales compuestos volátiles generados en la fermentación de mosto de *Agave angustifolia* y en medio sintético en diferentes temperaturas, así como el consumo de la principal fuente de carbono, efectuadas por 4 cepas de *S. cerevisiae* previamente aisladas de mostos de agave provenientes de diferentes mezcalerías del Estado de Oaxaca.

Las fermentaciones se realizaron en laboratorio, en 2 condiciones controladas de temperatura. Durante la fermentación en el medio sintético se cuantificó fructosa y ácidos orgánicos mientras que en el mosto de agave se identificaron y se cuantificaron: glucosa, fructosa y ácidos orgánicos, empleando cromatografía de líquidos de alta resolución. Al final de cada fermentación se identificaron y se cuantificaron los principales compuestos volátiles, empleando microextracción en fase sólida para cromatografía de gases. Finalmente, por el método estadístico LSD de Fisher se determinaron las diferencias entre los diferentes tratamientos.

INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica Mexicana obtenida de la fermentación y destilación de mostos preparados a partir de tallos maduros de agaves como: *Agave angustifolia* (maguey espadín); *Agave esperrima* (maguey de cerro, bruto o cenizo); *Agave weberi* (maguey de mezcal); *Agave potatorum* (maguey de mezcal); *Agave salmiana* (maguey verde o mezcalero) y otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para la preparación de otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado (NOM-070-SCFI-1994, 1997).

La fermentación del mezcal se inicia por sí misma con un amplio espectro de microorganismos tales como levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus* y bacterias como *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*. Como consecuencia, la fermentación de agave conduce a un proceso bioquímico complejo que implica interacciones entre microorganismos. La mayoría de las mezcalerías utilizan levaduras procedentes del ambiente y sin control durante la fermentación, lo cual conduce a un largo tiempo de fermentación y variabilidad en la calidad de la fermentación (Escalante-Minakata, 2008).

El mezcal es comúnmente comparado y relacionado con el tequila debido a que se elaboran de manera similar. La diferencia radica en la especie de agave que se utiliza en la materia prima. Es decir, el tequila es producido a partir de *A. tequilana* mientras que el mezcal es elaborado a partir de diversas especies de agave. La mayoría de los compuestos encontrados en el mezcal son similares a los reportados en el tequila y otras bebidas alcohólicas (De León-Rodríguez, 2008; Cabib, 2008).

La gran mayoría de los compuestos volátiles presentes en el mezcal son derivados de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos producidos por medio de diversas rutas biosintéticas que ocurren a lo largo del proceso de elaboración, esto es, el cocimiento, la fermentación y el almacenamiento (Arellano, 2011).

Los compuestos volátiles, cuya mezcla compleja, definen los atributos sensoriales de aroma y sabor del mezcal (Vallejo, 1990).

Actualmente, se realizan estudios acerca de la cuantificación de compuestos de sabor y aroma del mezcal como producto terminado así como también durante la fermentación. El presente estudio se enfoca en la cuantificación de estos compuestos al final de la fermentación utilizando levaduras nativas del mezcal siendo así la base para el desarrollo sustentable durante el proceso fermentativo.

El propósito de este estudio fue evaluar, a través del análisis químico, a las cepas de levaduras aisladas de la fermentación del mezcal del Estado de Oaxaca en medio sintético y jugo de *Agave angustifolia* en términos de los principales productos generados, así como también identificar aquellos productos que puedan ser distintivos de cada cepa en las condiciones de fermentación establecidas.

ANTECEDENTES

Alimentos y bebidas fermentadas

El consumo de alimentos y bebidas fermentadas es una de las actividades más antiguas del hombre. Los procesos anaeróbicos de generación de energía son la base de muchos descubrimientos importantes: los alimentos fermentados y las bebidas alcohólicas. La principal aplicación descubierta de las fermentaciones láctica y alcohólica fue un método de conservación de alimentos (Steinkraus, 1996)

Un alimento o bebida fermentada es el resultado del cambio bioquímico de la matriz original, dada por la acción de uno o varios microorganismos en condiciones de baja concentración de oxígeno y cuyas características son distintas al alimento original (Campbell–Platt, 1994). Algunos ejemplos de bebidas alcohólicas fermentadas son: el pulque, cerveza, pozol, entre otras.

El pulque es la bebida alcohólica más antigua de México, producida por la fermentación del aguamiel del agave, otras bebidas producidas a partir del agave son el tequila, la bacanora y el mezcal. México cuenta con una gran variedad de bebidas fermentadas producidas a partir de diferentes sustratos como plantas, frutas y granos como son el pozol y tesguino que se preparan a partir del maíz, el tepache a partir de la piña, el téjate a partir de cacao, el mezcal y el tequila a partir del agave, entre otras bebidas fermentadas tradicionales (Wacher, 2014).

Antes de la llegada de los españoles a México, el pulque representaba la principal bebida alcohólica fermentada. Posteriormente, una vez establecidos en el país, se introdujo el proceso de destilación, a partir de este proceso surgieron bebidas con alto contenido alcohólico provenientes del agave, a las que originalmente se les llamó “vino de agave” o “vino del mezcal”, la palabra mezcal se deriva de la palabra náhuatl mexcalmetl que significa agave (Aguirre–Rivera, 2001).

El mezcal es un producto cuyo efecto económico sobre sale de las bebidas alcohólicas tradicionales de México ya que es una fuente de ingresos importante para las regiones productoras y en la actualidad son reconocidas a nivel mundial (COMERCAM, 2013). A pesar de que muchas de las bebidas fermentadas

tradicionales de México no se reportan con una actividad económica fuerte, estas tienen importancia alimentaria, social y cultural, por ejemplo: el pozol, el pulque y la taberna que contienen probióticos que mejoran la digestión y son ricos en vitamina B que previenen la pelagra (Steinkraus, 1996).

Mezcal

El Mezcal es producido por la destilación del mosto fermentado de varias especies de agave. Para la producción comercial de los diferentes tipos de mezcal (tequila, mezcal, bacanora y raicilla), se utilizan diversas especies de agave. (García-Mendoza, 1998).

El proceso de elaboración del mezcal está sujeto a la NOM-070-1994, y establece que el mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de las piñas de los agaves mezcaleros maduros, previamente hidrolizados o cocidos, sometidos a fermentación con levaduras, permitiéndose adicionar hasta un 20% de otros azúcares (externos al del agave).

De acuerdo a la regulación oficial, el mezcal se clasifica en dos tipos: mezcal 100% de agave y mezcal adicionado. El mezcal 100% agave se caracteriza porque todos los azúcares provienen del agave, mientras que el mezcal adicionado puede contener hasta con un 20 % de azúcares que no provienen del agave. El mezcal se subdivide en tres categorías: mezcal añejo, el cual se somete a un proceso de maduración de por lo menos un año de almacenamiento en recipientes de madera de roble blanco o encino; mezcal reposado que es almacenado por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino y mezcal joven que es embotellado al concluir la destilación (NOM-070-SCFI-1994, 1997).

Denominación de origen del mezcal

El mezcal tiene denominación de origen. Los estados que cuentan con Denominación de Origen del mezcal son (Figura 1): Oaxaca, Guanajuato, San Luis Potosí, Guerrero, Durango, Tamaulipas y Zacatecas (NOM-070-SCFI-1994, 1997).

Aunque el mezcal se produce en diferentes estados del país, Oaxaca es el estado en donde se encuentra el mayor número de productores, lo cual se convierte en una actividad económica importante para este estado. En el 2013, a nivel nacional el estado de Oaxaca representó el 99% (12 mil productores) en la producción del mezcal certificado (COMERCAM, 2013).

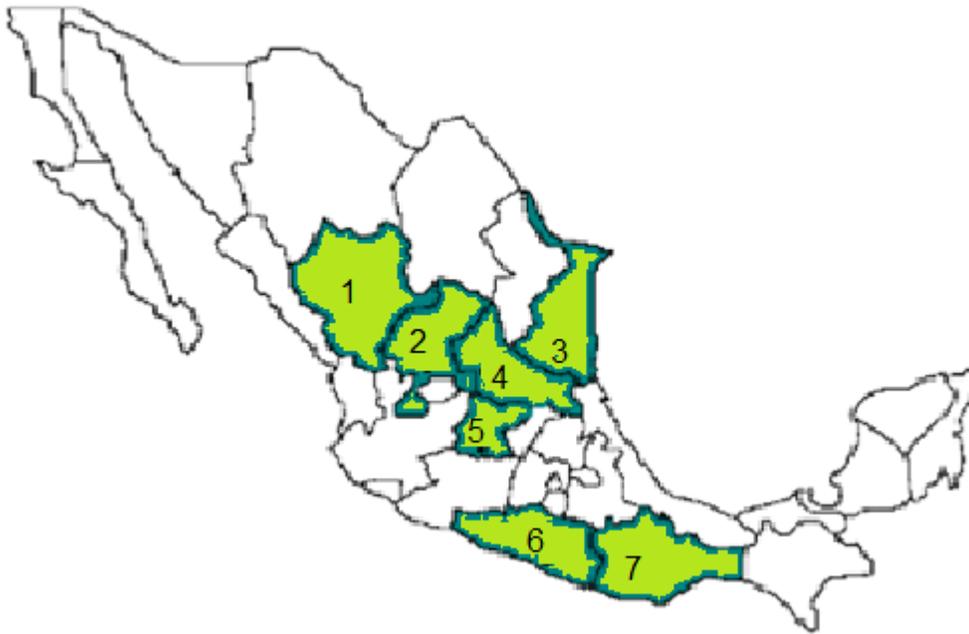


Figura 1. Estados con Denominación de Origen del Mezcal. Durango (1), Zacatecas (2), Tamaulipas (3), San Luis Potosí (4), Guanajuato (5), Guerrero (6) y Oaxaca (7). Fuente: (Comité Nacional Sistema Producto Maguey Mezcal, 2011).

Regiones productoras de agave y mezcal en Oaxaca

En Oaxaca se han identificado 23 especies de agaves cultivados y silvestres que son empleados en la fabricación del mezcal; las especies de *Agave salmiana*, *A. potatorum* Zucc, *A. weberi*, *A. esperrima* y *A. angustifolia* son consideradas las más importantes para la elaboración de esta bebida (Peña-Álvarez, 2004).

La producción de agave (*A. Angustifolia*) y mezcal en Oaxaca se realiza en la “Región del Mezcal” debido a sus características agroclimáticas que favorecen la producción de agave. Estos se desarrollan en suelos arcillosos de clima semiseco a una temperatura entre 20 a 30 °C y a una altura de 1500 metros sobre el nivel del mar. La región de los Valles Centrales destaca por la producción de agave y mezcal (Figura 2) y se encuentra constituida por 7 distritos políticos (Figura 3): Tlacolula, Yautepec, Miahuatlán, Ejutla, Ocotlán, Zimatlán y Sola de Vega (Bautista, 2008).



Figura 2. Regiones del Estado de Oaxaca. Fuente: (*Sistema de Información Básica Municipal del Estado de Oaxaca, 2010*).



Figura 3. Distritos del Estado de Oaxaca. Fuente: (*Sistema de Información Básica Municipal del Estado de Oaxaca, 2010*).

Proceso de elaboración de mezcal

El proceso para la elaboración de mezcal está dividido en: cosecha, corte, horneado, molienda, fermentación, destilación y envasado. Cuando el agave llega a su madurez, alrededor de 5 a 10 años, dependiendo de la variedad. En el caso de *A. angustifolia* su madurez llega alrededor de los 8 años. Posteriormente, se cortan las hojas dejando limpio el tallo o "piña". Las piñas se seccionan y se transportan a las fábricas de mezcal (Silva, 1999).

Cocimiento

Una vez que los tallos se han cortado, se colocan en un horno, que consiste en un pozo circular recubierto de piedra y lodo. Las rocas se calientan con leña hasta alcanzar el "rojo vivo". También, se puede realizar el cocimiento en hornos de ladrillo a una temperatura de 100°C. Con la finalidad de que el calor se conserve y se logre el pleno cocimiento del agave, todo se recubre de una capa de bagazo seco o plástico, encima del cual se coloca tierra. El proceso de cocimiento tarda de dos a cuatro días (Silva, 1999). La cocción excesiva que puede originar un sabor ahumado al mezcal debido al aumento en la concentración de furfural en el producto final (Figura 4), además de reducir el rendimiento de etanol debido a la caramelización de los azúcares (Mancilla-Margalli & López, 2002).

Durante el cocimiento del tallo del agave, el pH se reduce en un rango de 5.5 a 4.5. La disminución del valor de pH y la temperatura influyen positivamente en la hidrólisis de los fructanos. La disminución de pH puede deberse a la formación de ácidos orgánicos o a la incapacidad de los grupos amino para actuar como bases en el proceso de hidrólisis, cuando los compuestos amino han reaccionado durante las reacción de Maillard (Mancilla-Margalli, 2006). Además de la presencia inicial de ácidos orgánicos del agave como: ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico (Martínez–Aguilar, 2009).

Los polifruktanos de agave son polímeros de fructosa ramificados mixtos. Su cadena principal la forman enlaces del tipo α (2-1), llamados tipo inulina (Figura 5). Otra cadena se proyecta desde la unidad de glucosa en sentido opuesto, unida por un enlace tipo α (2,6) y α (2,1), es decir la glucosa queda interna conocido entonces como tipo neoserie. También tienen ramificaciones formadas con enlaces tipo β (2,6), enlace típico de los levanos (García-Soto, 2011). Éste es el polisacárido de reserva más abundante en los agaves y es hidrolizado en medio ácido a altas temperaturas (70-80°C), generando fructosa (97%) y glucosa (3%) (Waleckx, 2008). De esta manera, durante el cocimiento se obtiene un líquido dulce que es recolectado y usado como fuente principal de azúcares fermentables.

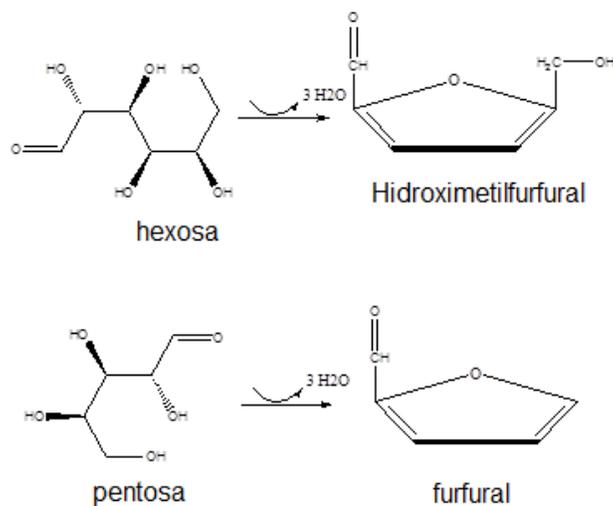


Figura 4. Formación de furfurales. La hidrólisis ácida a temperaturas altas de monosacáridos, sufren deshidratación que conduce a la formación de un anillo pentagonal de furfural o hidrometilfurfural, según se parta de pentosa o hexosa.

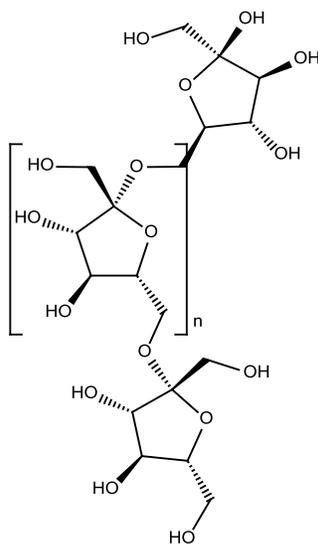


Figura 5. Estructura química de la polifruktosa

Molienda

La molienda puede ser manual o mediante molino de piedras de cantera o de concreto circulares (molino chileno). Los molinos de piedra son jalados por mulas o caballos permitiendo que comience a rodar y las piñas sean molidas. La molienda manual se realiza con simples mazos de madera en forma de martillo y es característico de lugares con bajo volumen de producción de mezcal y elaboración no continua, pues exige un esfuerzo físico desgastador (Silva, 1999).

Durante la molienda se obtiene el jugo de agave que es recolectado y colocado en recipientes de madera o de acero inoxidable, el cual es diluido hasta obtener 12 a 14° Brix (80–100g/mL) (Aguilar–Uscanga, 2007). Otro producto que se genera es el bagazo, que representa entre el 14 y 20% del peso total del tallo (Martínez-Gutiérrez, 2012).

Fermentación

En esta etapa, los azúcares obtenidos de la molienda, principalmente la fructosa, se transforman en etanol y dióxido de carbono, que sale a la superficie en forma de burbujeo, por medio de la fermentación alcohólica por las levaduras. También por medio de otras rutas metabólicas se producen otros compuestos que dan aroma y sabor. Esta operación se lleva a cabo en barricas de roble o de acero inoxidable durante un tiempo aproximado de 3 a 8 días a temperatura ambiente que oscila entre los 25°C y 32°C (Silva, 1999).

Destilación

La destilación es un método donde se separa mediante vaporización una mezcla líquida de sustancias miscibles y volátiles en sus componentes individuales, o bien en algunos casos en grupo de componentes, tal como el mezcal. El objetivo de la destilación del mezcal es separar y concentrar el alcohol producido en la fermentación. Existen varios tipos y grados de destilación, por ejemplo, la destilación rudimentaria se basa en que una vez concluida la fermentación se lleva el jugo a recipientes de barro que están adaptados de manera que al ebulir el líquido se condense en una tapa metálica, utilizando como refrigerante el agua, y el destilado

se deposita en un recipiente de recolección. Otro de tipo de equipo de destilación son los alambiques, que están constituidos por: una olla donde se coloca la pulpa; cabezote, tapa de la olla; turbante o pasa vapores, que conecta a una campana; serpentina o culebra de cobre y horno de leña (Andrade, 2006).

En la destilación se obtienen varias fracciones: punta, cuerpo y cola. La composición de cada fracción varía en la concentración de compuestos. En general, en las puntas se encuentran aquellos compuestos de menor punto de ebullición tales como el acetato de etilo, metanol, 1-propanol, 2-propanol. En el cuerpo se encuentra una mezcla de compuestos con puntos de ebullición intermedios como 1-butanol, alcoholes superiores y acetaldehído. En la cola se encuentran aquellos compuestos con mayor punto de ebullición como el alcohol isoamílico, 2-furfuraldehído y ácido acético (Cedeño, 1995).

El proceso de destilación dura aproximadamente seis horas. El producto de la punta tiene un alto contenido alcohólico (80° a 90°), el cuerpo o común tiene entre 20° a 40° y la cola tiene entre 10° a 15° de alcohol. Las puntas o cabezas se separan en barricas, aparte del cuerpo; siendo colocadas las colas en otro lugar o se vuelven a la próxima olla para ser redestilado. Las colas se utilizan generalmente para ajustar el grado alcohólico (con el fin de darle el grado para su venta: 43°– 50°), aunque con esto se agregan al producto alcoholes pesados (metanol, etanol y propanol), olores desagradables y otros contaminantes (FAO, 1991).

Envasado

El envasado se realiza en forma manual en botellas de vidrio o de plástico de diferentes capacidades y presentaciones (Silva, 1999).

Levaduras

Durante la fermentación del mezcal destacan las levaduras *Saccharomyces* tal como *S. cerevisiae* y *no-Saccharomyces* tal como *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia kluyveri* (Segura–García, 2014; Valdez, 2011). La importancia de las levaduras durante la fermentación es la producción de compuestos volátiles tales como etanol, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, entre otros, que son los principales responsables del sabor y aroma en el mezcal (Arellano, 2011).

Saccharomyces es un microorganismo unicelular que pertenece al grupo grande y variado de ascomicetos. Las células de *Saccharomyces* son normalmente esféricas, ovales o cilíndricas y su división celular normalmente es por gemación. Las levaduras de mayor relevancia comercial en la producción del pan y de la mayoría de las bebidas alcohólicas son del género *Saccharomyces*, en especial *Saccharomyces cerevisiae* para producir etanol, ácido láctico y CO₂. Su nombre significa saccharo: azúcar y myces: hongo. Las levaduras están distribuidas en varios materiales ricos en azúcar, como en zumos y néctares de frutas, pueden llevar a cabo los dos tipos opuestos de metabolismo quimioorganótrofo: la fermentación y la respiración (Madigan, 2009).

En mezcal de Oaxaca, Andrade y Ruiz–Terán (2006) aislaron levaduras del género *Candida*, *Hanseniaspora*, *Rhodothorula*, y cepas de *S. cerevisiae*. Las levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* son los microorganismos que más abundan y cuyo efecto en la fermentación del mezcal es representativa. El alcohol y CO₂ entre otros metabolitos son producidos por vía anaeróbica.

La formación de compuestos volátiles, producidos por la acción de las levaduras, es muy importante en las bebidas alcohólicas y no solo depende de la especie de levadura, sino en particular, de la cepa. Por lo tanto, el resultado de cada fermentación puede ser diferente según las particularidades genéticas y fisiológicas de las levaduras sometidas a diferentes condiciones ambientales de fermentación (Suárez, 2004).

Requerimientos nutricionales de las levaduras

La nutrición microbiana es un aspecto fisiológico que depende de la composición química de la célula y de factores del medio ambiente. En general, los requerimientos nutricionales reflejan el ambiente natural en que viven y el uso de medios de cultivo con composición química definida, son de primordial importancia en el estudio de la nutrición microbiana (Ramírez-Gama, 2001).

Las levaduras requieren proporciones apropiadas de nutrientes, tales como agua, carbono, nitrógeno y otros macronutrientes necesarios para la síntesis de los componentes celulares tales como fósforo y magnesio, así como microelementos (potasio, magnesio, hierro, azufre y fósforo), vitaminas y otros factores que son cruciales para el crecimiento y la actividad metabólica. Los nutrientes son asimilados por levaduras directamente a partir de medios de cultivo en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos (Joslyn, 1951).

Los microorganismos utilizan diversas fuentes de nitrógeno para sintetizar proteínas y otras moléculas intracelulares nitrogenadas. Las levaduras pueden asimilar compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, ya sea orgánicos como péptidos, aminoácidos, amidas o mineral como sales de amonio, amoníaco o urea (Joslyn, 1951).

El azufre es esencial para la síntesis de las proteínas contenidas en el protoplasma. Sus fuentes son sulfatos solubles en agua o compuestos orgánicos tales como aminoácidos de azufre como la cisteína (Jones, 1990).

El fósforo es asimilado principalmente como fosfatos de sodio o de potasio. Desempeña un papel importante como un componente de lecitina y nucleoproteínas y un participante de numerosos procesos enzimáticos.

El magnesio es esencial para el desarrollo adecuado de protoplasma y el funcionamiento de muchos procesos de fermentación. Los iones de magnesio afectan a la integridad y permeabilidad de la membrana citoplasmática debido a que forman complejos con fosfolípidos de construcción de la bicapa.

La deficiencia de magnesio provoca disminución en la permeabilidad de estas membranas, que a su vez resulta en la concentración intracelular elevada de iones de calcio y de sodio y la disminución de contenido de iones de potasio y fósforo. Los iones de magnesio son componentes de los ribosomas y participan en la estabilización de las moléculas de ADN y ARN (Pietruszka *et al.*, 2010).

Los suplementos como las sales minerales, las vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos insaturados presentes en el medio afectan en el rendimiento del metabolito primario (etanol) y pueden reducir o aumentar algunos subproductos. Por ejemplo la adición de aminoácidos puede mejorar la síntesis de alcoholes superiores aunque el 50% o más de ellos derivan de azúcares (Pietruszka *et al.*, 2010)

Se ha reportado que el agave contiene principalmente agua: 60%, inulina: 24%, fibras: 11%, azúcares reductores: 1.5%, proteínas: 0.02% y cenizas: 2.7% (Lanckenmeier *et al.*, 2006; Bautista-Justo, 2001; Muñoz *et al.*, 2005) y los principales minerales en mosto de agave son calcio, magnesio y fosfato (Arrizon *et al.*, 2006).

Metabolismo

Los seres vivos adquieren y utilizan la energía libre para realizar sus funciones metabólicas. El metabolismo tiene como objetivo obtener energía química a partir de la captación de energía solar (organismos autótrofos) o degradando nutrientes obtenidos del ambiente (organismos heterótrofos), convertir las moléculas obtenidas a partir de nutrientes a moléculas características de la propia célula, sintetizar y degradar biomoléculas requeridas en funciones celulares especializadas.

El metabolismo es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, a través de una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas o vías metabólicas.

El metabolismo se clasifica en catabolismo y anabolismo (Figura 6). El catabolismo es el conjunto de reacciones que convierten moléculas en energía utilizable (producen energía). Las vías catabólicas son de tipo degradativo y químicamente son procesos oxidativos. El anabolismo es el conjunto de reacciones que requieren

energía para producir moléculas complejas. Las vías anabólicas son rutas de biosíntesis, son procesos reductores y requieren un aporte de energía externo (Carmona–Salazar, 2012)

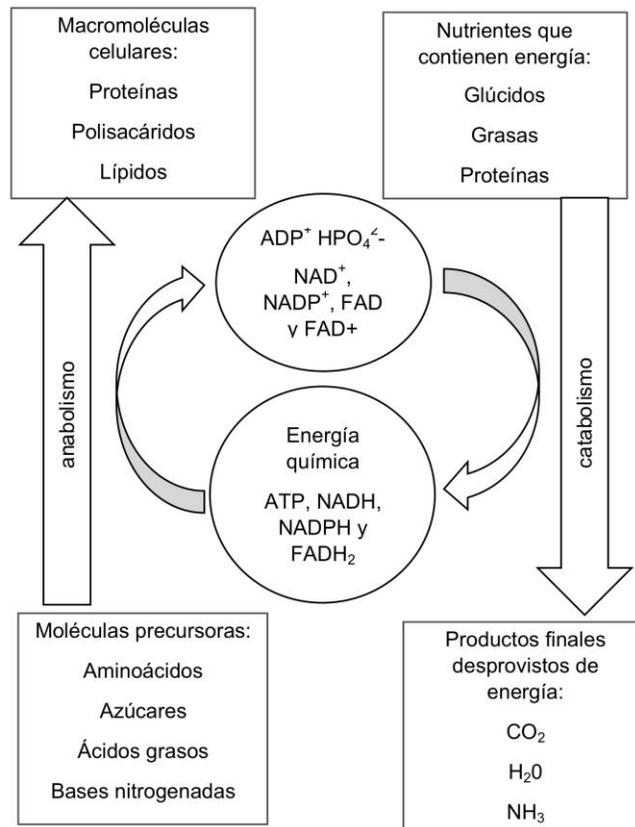


Figura 6. Tipos de metabolismo. Relación energética entre catabolismo y anabolismo, donde las rutas catabólicas suministran energía química en forma de ATP, NADH, NADPH y $FADH_2$) que es utilizada en las rutas anabólicas para convertir moléculas precursoras pequeñas en macromoléculas. Fuente de Compendio de bioquímica, Facultad de Química.

Vías metabólicas de las levaduras: Glucólisis y fermentación

La glucólisis es la oxidación parcial de la glucosa hasta la obtención de piruvato. En condiciones aerobias, se realiza la oxidación total de la glucosa hasta obtener CO_2 , mejor conocido como respiración celular, que comprende de tres vías: glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Con la oxidación total de la glucosa durante

la respiración celular se obtiene un gran número de moléculas de ATP. En condiciones anaerobias, el piruvato se reduce a lactato o a etanol (Mathews, 2002).

La glucólisis se lleva a cabo en el citosol y consiste en 10 reacciones enzimáticas agrupadas en dos fases: Activación de la glucosa por fosforilación y la síntesis de moléculas de alto contenido energético. En la primera etapa se invierte energía (2 moléculas de ATP) y se lleva a cabo la hidrólisis de una hexosa para la formación de dos triosas fosfato (gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona fosfato), mientras que en la segunda fase se da la síntesis de moléculas con alto contenido energético, en esta etapa se forma energía (ATP; 1,3-bifosfoglicerato; fosfoenolpiruvato) (Mathews, 2002).

El NADH formado en la glucólisis debe ser regenerado a NAD^+ , para reciclarse, pues es una coenzima que se utiliza activamente en múltiples reacciones del metabolismo. Esta regeneración puede ocurrir en dos condiciones: condición aeróbica que se da durante la fosforilación oxidativa o en condición anaeróbica que se da en la fermentación láctica (en músculo, eritrocitos o bacterias) o en la fermentación alcohólica (en levadura y otros microorganismos) (Figura 7). Por ende, la fermentación es el resultado de la actividad enzimática de los microorganismos.

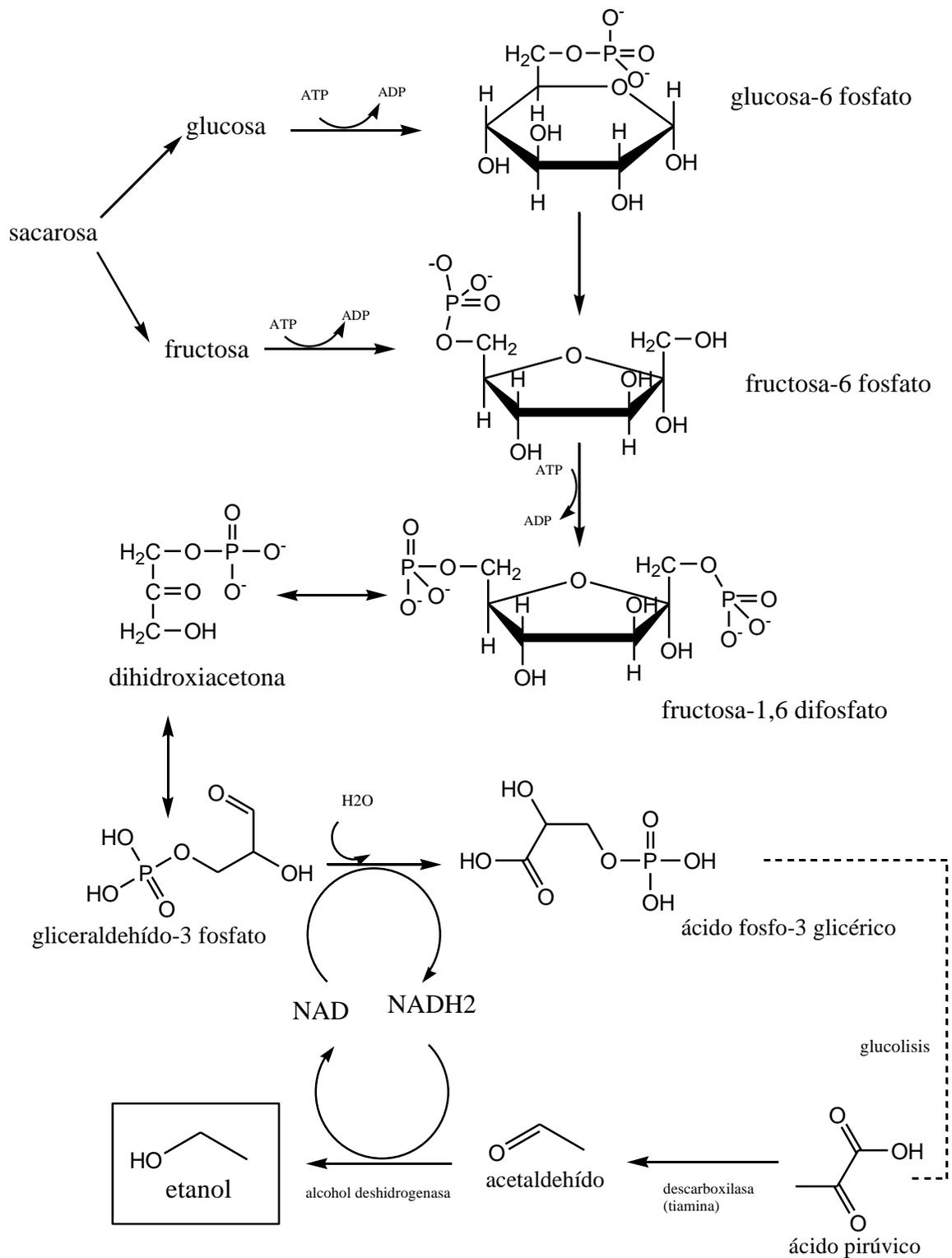
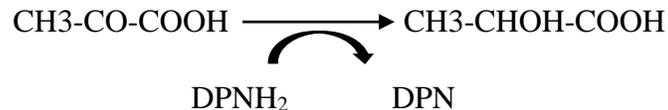


Figura 7. Fermentación alcohólica: degradación de azúcares por las levaduras (Suárez, 2004).

Ácidos orgánicos formados en la fermentación

Ácido láctico

Una hipótesis para la formación de ácido láctico durante la fermentación del mosto es que puede proceder de la degradación de los glúcidos vía fermentativa, por reducción biológica del ácido pirúvico en presencia de DPHN₂ (dinitrofenilhidracina) y del sistema enzimático correspondiente (Suárez, 2004):



Ácido acético

El mecanismo bioquímico de las distintas especies de levaduras para la formación de ácido acético es por descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico (Suárez, 2004).

Compuestos volátiles en el agave.

En estudios realizados por Martínez–Aguilar (2009) y Peña-Álvarez (2004) se reportó el perfil de ácidos grasos y terpenos (gerandiol, linalool, limoneno, y 4-terpineol) de *A. angustifolia*, *A. salmiana* y *A. tequilana*. Los terpenos son compuestos volátiles importantes que provienen de los agaves, que en bajas concentraciones confieren características particulares al producto final.

Compuestos volátiles producidos durante la fermentación

Aparte de etanol y dióxido de carbono, las células de levadura también producen una amplia gama de metabolitos secundarios como ésteres, aldehídos y alcoholes que están presentes en el mezcal (De León-Rodríguez, 2008).

Metanol

La producción de metanol es inherente durante la fermentación alcohólica porque es producido a partir del cocimiento de la pectina y la lignina de la pared celular de la piña (Lappe-Oliveras, 2008).

Ésteres

El acetato de etilo y acetato de isoamilo son los compuestos que se han identificado en el mezcal y están relacionados con sabores frutales (Santillán et al. 1998). Proviene del metabolismo secundario de las levaduras. La síntesis de los ésteres por *Saccharomyces cerevisiae* es intracelular y utiliza la energía proporcionada por los enlaces tioéster de acetil CoA. La enzima alcohol acetil transferasa es responsable de la mayor parte de la producción de éster de acetato en la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* (Suárez, 2002).

Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son los principales compuestos que dan aroma y sabor al mezcal. Estos alcoholes tienen un fuerte impacto en la calidad del producto (Hazelwood, 2008). Algunos productos y marcas de bebidas alcohólicas han determinado el equilibrio de estos compuestos como perfil organoléptico característico de su producto (Meligaard, 1975).

Las concentraciones de alcoholes superiores varían entre 0,1 y 0,7% en relación con el etanol producido. Alcohol isoamílico (60-80%), isobutanol (15-25%) y n-propanol (4-7%) son las más abundantes de alcoholes de fusel (Lachenmeier, 2007).

Se han propuesto dos rutas metabólicas de formación de alcoholes superiores (Figura 8): ruta catabólica de Ehrlich y ruta biosintética o anabólica derivado de azúcares (Kobayashi, 2008).

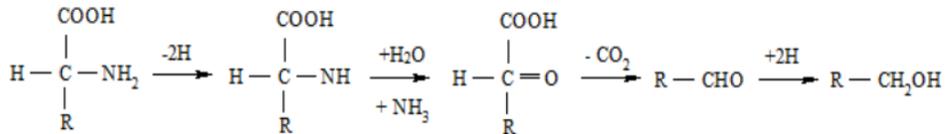
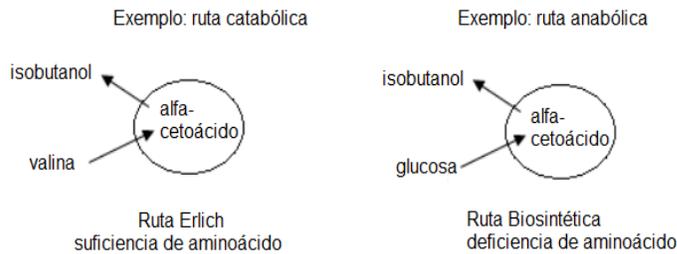


Figura 8. Alcoholes superiores (fusel) producidos por el metabolismo de las levaduras por dos rutas donde utilizan alfa-cetoácido.

A principios del siglo pasado (1970) Felix Ehrlich propuso que algunos aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano y tirosina) son asimilados durante la fermentación. El grupo aminado del aminoácido es eliminado por la transaminación y el ácido cetónico correspondiente, el cual no puede ser dirigido al metabolismo del carbono central, es descarboxilado a un aldehído. Este aldehído puede ser reducido por la enzima alcohol deshidrogenasa característico de la fermentación alcohólica, formándose un alcohol superior que posee un carbono menos que el aminoácido de origen (Chen, 1978).

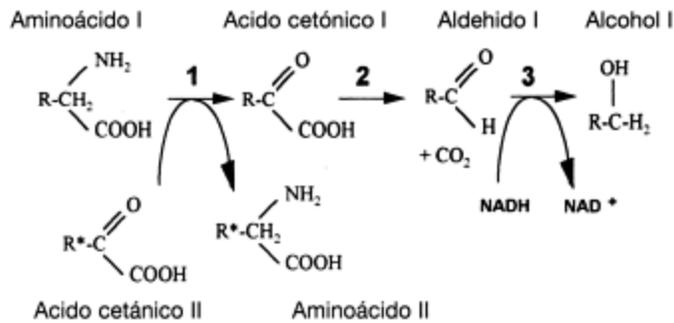


Figura 9. Síntesis de alcoholes superiores a partir de los aminoácidos y de los ácidos cetónicos. 1 reacción de transaminación 2: reacción de descarboxilación 3: reacción de deshidrogenación.

Elrich encontró que el 2-metilbutanol, 3-metilbutanol y alcoholes isobutilo se obtuvieron a través de la descarboxilación y desaminación de leucina, isoleucina y valina, respectivamente.

En la ruta biosintética o anabólica, los alcoholes pueden derivar del metabolismo de los carbohidratos los cuales proporcionan la principal fuente de carbono para la síntesis de aminoácidos (Chen, 1978).

Cabe mencionar que se han propuesto otras vías de síntesis de los alcoholes superiores como las rutas conectadas de síntesis de aminoácidos, tales como leucina, isoleucina, valina y treonina y alcoholes superiores tales como n-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol donde posición central en el esquema es ocupado por el piruvato y ácido acético activado (acetil-CoA) (Pietruszka, 2010). Piruvato, cetobutirato y cetoisovalerato son los ácidos ceto que se descarboxilan además a alcoholes superiores. Sin embargo aún no han sido determinados con certeza a qué mecanismo metabólico corresponde.

Existe una relación directa entre un alcohol superior y del aminoácido del cual proviene (Figura 10). No obstante es difícil ligar la síntesis de un alcohol superior particular con una composición determinada de los aminoácidos. Los principales alcoholes superiores sintetizados durante la fermentación alcohólica son: n-propanol, isobutanol, alcohol amílico e isoamílico.

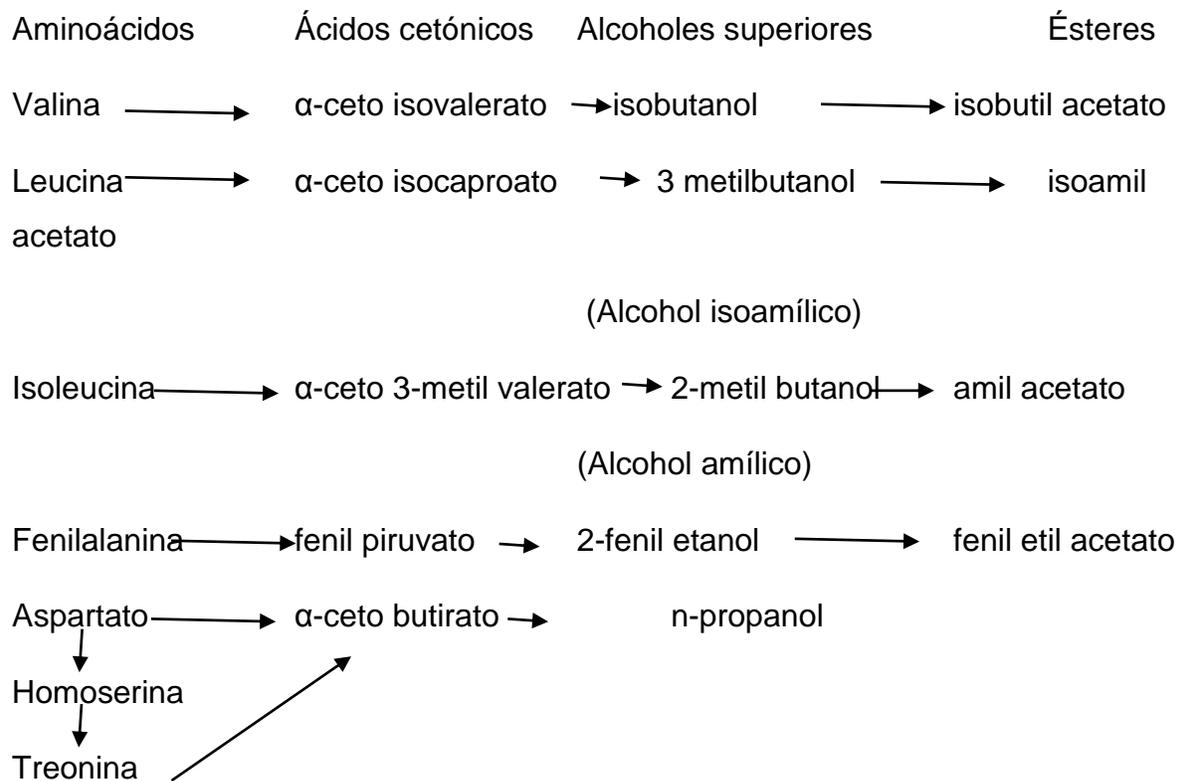


Figura 10. Esquema de la relación entre aminoácidos, ácidos cetónicos, alcoholes superiores y ésteres.

Factores que afectan en la producción de alcoholes superiores.

Existente diversos factores que afectan la cantidad de estos compuesto tales como: el tipo y calidad de la materia prima, condiciones de cocción, condiciones de fermentación (temperatura y pH), tipo de levadura y cantidad de suplementos nutricionales adicionados al mosto.

Método instrumental: Cromatografía y microextracción en fase sólida

Los métodos instrumentales son los más utilizados para detectar y cuantificar compuestos en bebidas alcohólicas. Existen diferentes técnicas para el análisis de compuestos en bebidas alcohólicas entre ellas la cromatográfica.

La microextracción en fase solida (MEFS) fue desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990 (Pawliszyn *et al.*, 1990). La técnica de MEFS utiliza una fibra de sílica fundida que se encuentra recubierta en la parte exterior con la fase

estacionaria. El analito de la muestra es directamente extraído y concentrado en la recubierta de la fibra. Este método ahorra tiempo de preparación, no usa disolventes y es muy sensible a la recuperación de compuestos volátiles (Pawliszyn, 1997).

HIPÓTESIS

Si las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del mezcal son diferentes a nivel de cepa y fueran evaluadas con respecto a la producción de los principales compuestos volátiles, en condiciones controladas de temperatura en medio sintético y en mosto de agave entonces, las características fisiológicas de cada cepa serán diferentes y como consecuencia las concentraciones de los principales compuestos volátiles variarán entre cada cepa.

OBJETIVOS

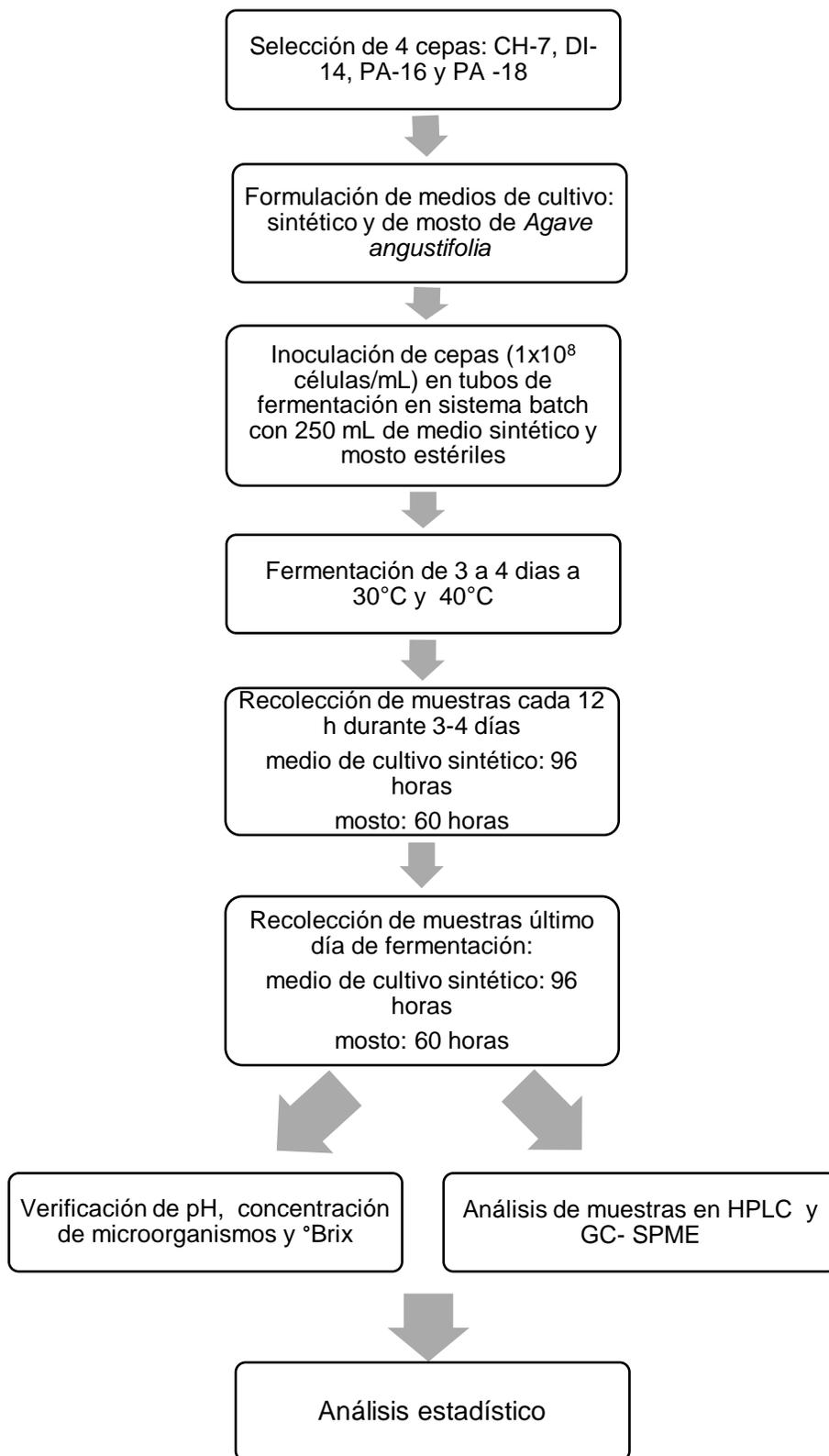
Objetivo general

- Determinar los principales compuestos volátiles producidos por 4 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas durante la etapa de fermentación en la producción del mezcal en el estado de Oaxaca, en jugo de *Agave angustifolia* y en medio sintético con 2 condiciones de temperatura.

Objetivos particulares

- Evaluar si diferentes condiciones de temperatura, durante la fermentación influyen en la producción de los principales compuestos volátiles de las levaduras.
- Estudiar la relación del consumo de azúcares en la fermentación y el porcentaje de etanol producido.
- Identificar qué cepa y bajo qué condiciones presentan mayor producción de compuestos volátiles, entre los tratamientos, al final de las fermentaciones.

METODOLOGÍA



MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levaduras

Las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este estudio fueron aisladas de mostos de mezcal procedentes de diferentes regiones de Oaxaca (Tabla 1). Estos microorganismos fueron identificados previamente a nivel de cepa por Martínez-Zepeda (2014). La selección de las cepas se basó en los fragmentos delta de los cuales no presentaron similitud entre las cepas. Las cepas se nombraron como CH-7, DI-14, PA-16 y PA-18, fueron conservadas en caldo YPD con glicerol al 30% a una temperatura de -80°C en el laboratorio (Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM).

Tabla 1. Lugar de procedencia de las cepas de levaduras.

cepa	distrito	municipio
CH-7	Tacolula	Guelavila
DI-14	Tlacolula	Matatlán
PA-16	Ocotlán	Chichicapam
PA-18	Ocotlán	Chichicapam

Preparación de los medios de cultivo

Medio de cultivo sintético

El medio de cultivo sintético se formuló con la siguiente composición: 10% de fructosa, 0.22 % de fosfato dipotásico, 0.1 % de extracto de levadura, 0.1% sulfato de magnesio heptahidratado, 0.093 % de nitrato de sodio y 50 mL de H₂SO₄ al 1.25% (Segura-García, 2014). La fuente de carbono, nitrógeno y las sales minerales se esterilizaron por separado, posteriormente, se procedió a mezclarlos.

Medio natural: mosto de *A. angustifolia*

Una piña madura de agave mezcalero (*A. angustifolia*) fue recolectada en el estado de Oaxaca. El Agave se cortó en trozos pequeños y se colocaron en recipientes de plástico resistentes a altas temperaturas. A los recipientes se les agregó agua destilada hasta cubrir los trozos de piña para evitar que se pegara en el fondo del recipiente, después se adicionó ácido sulfúrico y agua destilada en una proporción de 1:100. Los trozos de piña se esterilizaron en autoclave a 105°C durante 3 h. La disminución del pH y la temperatura alta utilizada en la autoclave facilitan la hidrólisis de los polifruktanos contenidos en la piña de Agave.

Concluido el tiempo de cocimiento se procedió a la molienda y separación de mosto del bagazo. Para la molienda se utilizó un extractor de jugos (Tur Mix). La concentración de sólidos totales en los mostos obtenidos se determinó midiendo los grados °Brix, utilizando un refractómetro (Atago, Brix 0.0-33.0%). En base a la cantidad de sólidos totales, los mostos fueron diluidos o concentrados para ajustarse a 10°Brix. El pH del mosto se ajustó a un valor de 4.5. Luego de ajustar las condiciones del mosto para la fermentación, se esterilizó a 121°C durante 15 min, así como también la fuente de nitrógeno (1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) suplementada, es importante mencionar que el sulfato de amonio se esterilizó separado del mosto.

Preparación de inóculos

Las cuatro cepas de levaduras se sembraron en agar YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2%, glucosa 2% y agar bacteriológico 15%) y se incubaron a una temperatura de 30°C durante 18 h. Posteriormente, de cada cepa se tomó una colonia aislada y se inoculó en medio YPD líquido y se dejaron en agitación durante 16 a 18 h a una temperatura de 28°C. La concentración celular fue determinada por medición de la densidad óptica empleando un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-Visible GBC Cintral 101) a una longitud de onda de 520 nm y comparada con una curva patrón previamente realizada en el laboratorio 321 del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

El inóculo se preparó colocando 1 mL de cultivo en microtubos estériles y se centrifugaron (Centrifuge 5417R) a 14000 rpm a una temperatura de 4°C durante

10 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido fue lavado adicionando 1 mL de agua destilada estéril y centrifugando bajo las condiciones señaladas anteriormente, el sobrenadante fue desechado, esta operación se realizó tres veces con el fin de eliminar los residuos de medio YPD. Una vez concluido los lavados, el pellet celular se inoculó con la cantidad estimada de células de 1×10^6 cél/mL en los tubos de fermentación conteniendo 250 mL de medio de cultivo.

Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo en tubos enchaquetados de 450 mL con recirculación (Figura 11). En la Tabla 2 se muestra el diseño experimental con un total de 16 fermentaciones por lote con una concentración inicial de 1×10^6 cél/mL en condiciones semi-anaeróbicas sin agitación con temperaturas de 30°C y 40 °C . Cada fermentación se realizó por duplicado.

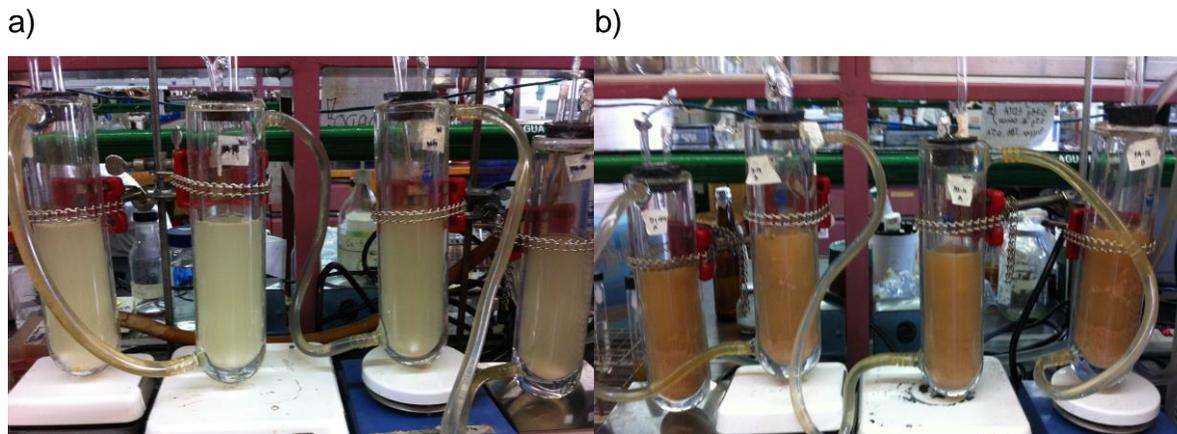


Figura 11. Sistema de fermentación: a) fermentación en medio de cultivo sintético y b) fermentación en mosto de agave.

Tabla 2. Diseño experimental factorial 2³ para la determinación de los principales compuestos volátiles

Tratamientos	Factores		
	Cepa	Medio	Temperatura
1	CH-7	Sintético	30
2	CH-7	Mosto	30
3	CH-7	Sintético	40
4	CH-7	Mosto	40
5	DI-14	Sintético	30
6	DI-14	Mosto	30
7	DI-14	Sintético	40
8	DI-14	Mosto	40
9	PA-16	Sintético	30
10	PA-16	Mosto	30
11	PA-16	Sintético	40
12	PA-16	Mosto	40
13	PA-18	Sintético	30
14	PA-18	Mosto	30
15	PA-18	Sintético	40
16	PA-18	Mosto	40

Muestreo y monitoreo de las fermentaciones

Las muestras de las fermentaciones de medio sintético fueron recolectadas cada 12 h por un período de 96 h. Mientras que las muestras de las fermentaciones en mosto, se tomaron cada 12 h durante 60 h. Las muestras fueron analizadas para determinar °Brix, pH y concentración celular. Posteriormente, las muestras se conservaron en congelación para su posterior análisis de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles.

Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Los sólidos solubles totales se determinaron empleando un refractómetro (Atago, Brix 0.0 -33.0%).

Determinación de pH de medios de cultivo durante la fermentación

La determinación de pH se realizó con tiras indicadoras de pH (Merck). La tira indicadora de pH se puso en contacto con la muestra hasta humedecer ligeramente y se comparó el color del papel con los colores estándares indicados por Merck.

Determinación de concentración celular

La concentración celular se determinó midiendo la densidad óptica de las muestras, empleando un espectrofotómetro (Espectrofotómetro UV-Visible GBC Cintral 101) a una longitud de onda de 520 nm y una curva patrón previamente estandarizada.

Determinación de azúcares

Las muestras de medio sintético se analizaron en términos de las concentraciones de fructosa del t_0 al t_8 y para las muestras de mosto de agave se determinaron las concentraciones de glucosa, fructosa del t_0 al t_5 .

Los análisis se realizaron empleando un cromatógrafo de líquidos Waters 1525 equipado con un detector de índice de refracción Waters 2414 y una columna Aminex® HPX-87, 300mm x 7.8 mm, la temperatura del horno fue de 40°C.

La fase móvil utilizada fue H_2SO_4 0.05 N, con una velocidad de flujo de 0.3mL/min. La concentración de los azúcares se determinó por el método estándar externo, a partir de curvas de calibración (Anexo 2).

Determinación de ácidos orgánicos

Las concentraciones de ácido láctico y ácido acético fueron determinadas en las muestras de medio sintético colectadas de t_0 al t_8 y para las muestras de mosto de agave se determinaron del t_0 al t_5 .

Los análisis se realizaron empleando un cromatógrafo de líquidos equipado con un detector ultravioleta Dual λ Abs Waters 2487 y una columna Aminex® HPX-87, 300mm x 7.8 mm, la temperatura del horno fue de 40°C.

La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0.05 N, con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. La concentración de ácidos orgánicos se determinó por el método estándar externo, a partir de curvas de calibración (Anexo 3).

Determinación de compuestos volátiles.

La determinación de los principales volátiles en medio sintético y mosto se hizo empleando un cromatógrafo de gases Aligent 6890N ® provisto con detector de ionización (FID) y una columna empacada Optima Wax® de 60m x 0.25 mm. El programa diseñado para este análisis consistió de una temperatura de 40°C por 5 min con incrementos de 5°C/min hasta 140°C y de 10 °C/min hasta 240°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. Los gases acarreadores fueron: H₂ a 40 mL/min, Aire a 400mL/min y N₂ mL/min a 28.3 mL/min. El tiempo de corrida fue de 45 min.

La técnica de extracción se llevó a cabo por microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (MEFS-EC), utilizando una fibra de Supelco Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) con 1.4 mL de muestra, con una saturación de 40 % de NaCl, a temperatura de 60°C con una agitación de 14 000 rpm durante de 30 min.

Para la determinación de los principales compuestos se utilizaron estándares de Sigma-Aldrich®: acetato de etilo 99.8%, etanol 99%, n-propanol 99.8%, 2-metil-1-propanol 99.5%, 2-metil-1-butanol 99% y 3-metil-1-butanol 99% .

La curva de calibración se hizo con el método de estándar externo, con un rango de concentración de 1 ppm a 200 ppm para todos los estándares excepto etanol que fue de 0, 2, 4, 6 y 8 %v/v (Anexo 2). Todos los análisis se hicieron por duplicado con las condiciones de extracción y cromatografías indicadas anteriormente con un tiempo de desorción de 20 min.

Para el análisis de las muestras se colocaron 1.4 mL en un vial y se extrajo por MEFS-EC con todas las condiciones anteriormente mencionadas.

Análisis estadísticos

Los análisis de los principales compuestos volátiles se realizaron por duplicado y se reportaron los promedios con sus respectivas desviaciones estándar. Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de LSD de Fisher (Least Significant Difference) para determinar las diferencias significativas entre cada tratamiento ($p \leq 0.005$). El análisis fue realizado con el software Statgraphics Centurion XV (Stat Point Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU).

Rendimientos

Para las fermentaciones se determinaron: porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$), productividad y rendimiento (Anexo 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso fermentativo para la elaboración del mezcal artesanal se considera como una fermentación en lote cuyo tiempo de fermentación puede variar por diversos factores: medio de cultivo, temperatura y tipo de microorganismo. Considerando lo anterior, las fermentaciones se llevaron a cabo en un sistema de fermentación en lote variando el tipo de medio de cultivo, temperatura y cepa.

En un estudio previo realizado por Martínez Zepeda (2014) las cepas CH-7, DI-14, PA-16 y PA-18 se tipificaron y se agruparon por similitud de sus fragmentos delta. De acuerdo al estudio, las cepas CH-7, DI-14, PA-16 y PA-18 no presentaron similitud. Lo anterior se puede confirmar con las concentraciones compuestos volátiles generados por cada cepa, es decir, cada cepa mostró un perfil metabólico diferente bajo los diferentes tratamientos. Durante las fermentación se verificó en el microscopio la pureza de éstos mismos.

La composición inicial de los medios de cultivo sintético y mosto se muestran en la Tabla 3. Ambos medios de cultivo contenían fructosa como fuente principal de carbono. Sin embargo, en mosto se detectó la presencia de glucosa y etanol a concentraciones bajas. Para la elaboración de mosto se utilizaron 2 piñas de agave para llevar acabo todos los tratamientos bajo las condiciones ya descritas.

Tabla 3. Concentraciones iniciales de azúcares (g/L) y etanol (%v/v) en medio sintético y en mosto de *Agave angustifolia*.

Medio	Composición			
	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Etanol
Sintético	100	nd	nd	nd
Mosto lote 1	105.91± 0.98	3.12±0.01	nd	0.49±0.01
Mosto lote 2	123.32±0.04	4.76±0.01	nd	0.45±0.01

nd: no detectado

El agave tiene un alto contenido de polifruktanos, al someterse a condiciones ácidas y temperaturas altas (100–105°C) los polifruktanos son hidrolizados en azúcares simples, como fructosa, glucosa y sacarosa (Cedeño, 1995; García-Soto, 2011).

El medio sintético se formuló con características similares al mosto de agave (Segura–García, 2014). Para obtener una concentración aproximada de azúcares en el mosto se formuló con 10°Brix.

Consumo de azúcares y crecimiento celular

En las gráficas 1, 2, 3 y 4 se presentan el consumo de azúcares y crecimiento celular a lo largo de las fermentaciones. La fructosa presente en el mosto fue consumida en un tiempo de 60 h, mientras que en el medio sintético este azúcar se consumió aproximadamente en 96 h.

En los tratamientos con la cepa CH-7 (Gráfica 1) se observa que el consumo de fructosa en mosto fue más rápido que en medio de cultivo sintético y, al final de las fermentaciones con la cepa CH-7, el consumo de fructosa fue mayor en mosto. En relación a la temperatura, el consumo de fructosa fue más rápida a 40°C. Siendo el tratamiento en mosto a 40°C con mayor consumo de fructosa (98.69%). El crecimiento de la cepa CH-7 (Gráfica 1) se observa que tiene un crecimiento similar con respecto al tipo de medio de cultivo. Por otro lado, se muestra que la temperatura si afecta en la dinámica de crecimiento ya que a 40°C la concentración de microorganismos fue menor.

En los tratamientos con la cepa DI-14 (Gráfica 2) se observa que el consumo de fructosa en mosto fue más rápido en medio de cultivo sintético. Al final de la fermentación se observa que el consumo de fructosa fue mayor en el mosto. Con respecto a la temperatura, en las fermentaciones en medio de cultivo sintético (Gráfica 2a), la cepa DI-14 consumió mayor cantidad de fructosa a 30°C que a 40°C. Mientras que en mosto de agave (Gráfica 2b) se observa que a lo largo de las fermentaciones presentaron fluctuaciones en el consumo de fructosa pero al final de las fermentaciones la cepa DI-14 consumió toda la fructosa a 30°C. El crecimiento de la cepa DI-14 (Gráfica 2) se observa que tiene un crecimiento similar con respecto al tipo de medio de cultivo. Por otro lado, se muestra que la

temperatura si afecta en la dinámica de crecimiento ya que a 40°C la concentración de microorganismos fue menor. El crecimiento celular de las cepas fue mayor en las fermentaciones de mosto a 30°C.

En los tratamientos con la cepa PA-16 (Gráfica 3) se observa que el consumo de fructosa fue más rápido en mosto que en el medio de cultivo sintético. En relación a la temperatura, el consumo de fructosa fue más rápida a 30°C. Siendo el tratamiento en mosto a 30°C con mayor consumo de fructosa (97.28%). El crecimiento de la cepa PA-16 (Gráfica 3) tiene un crecimiento similar en ambos medios de cultivo. La concentración de microorganismos fue mayor en las fermentaciones a 30°C en mosto de agave.

En los tratamientos con la cepa PA-18 (Gráfica 4) se observa que el consumo de fructosa fue más rápido en mosto que en el medio de cultivo sintético. Con respecto a la temperatura, se observa que tiene un comportamiento contrario a las demás cepas ya que ésta consumió más rápido sustrato a 40°C. Siendo el tratamiento en mosto a 40°C con mayor consumo de fructosa (99.00%). La concentración de microorganismos (Gráfica 4) se observa que tiene un crecimiento similar con respecto al tipo de medio de cultivo. También se muestra que la temperatura si afecta en la dinámica de crecimiento ya que a 40°C la concentración de microorganismos fue menor.

En general se observó que las 4 cepas consumieron el sustrato más rapido en mosto de *Agave angustifolia* que en medio de cultivo sintético. De acuerdo a lo reportado por Jacques (2003), esto podría pasar por la presencia de sulfato de amonio adicionado al jugo de agave. La adición de sulfato de amonio estimula el metabolismo y el crecimiento de las levaduras disminuyendo el tiempo de fermentación. Las levaduras acumulan rápidamente la fuente de nitrógeno en las primeras etapas de la fermentación (fase de adaptación y fase exponencial), utilizándolo para la biosíntesis de aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas y polímeros de la pared celular, mientras que el excedente se almacena en la vacuola celular (Jacques, 2003).

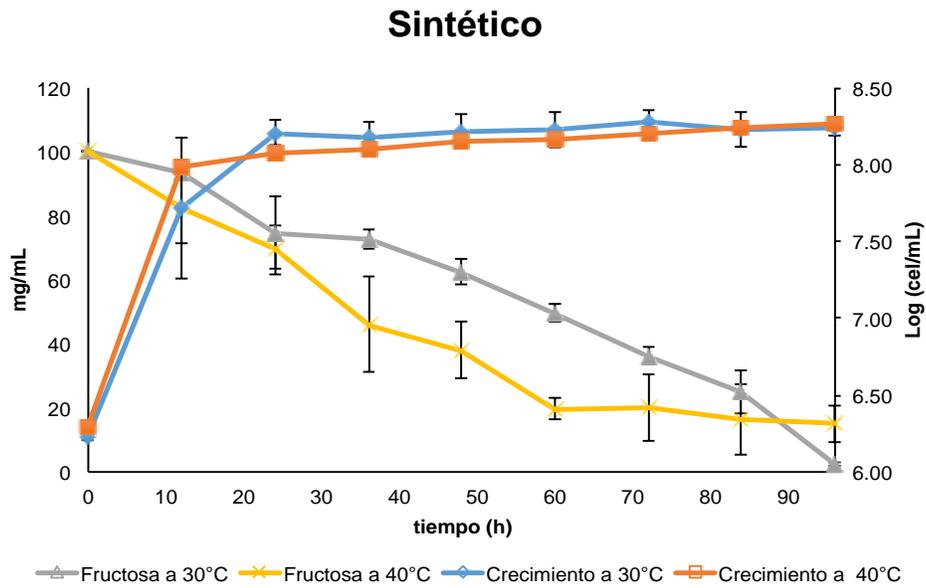
Estudios han demostrado que la temperatura afecta en la dinámica de crecimiento y en el consumo de sustrato durante la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* (Epifanio *et al.*, 1990). La viabilidad de las levaduras disminuye cuando la temperatura incrementa y algunas cepas son mejores a diferentes temperaturas en un rango de 10 a 30°C (Fleet & Heard, 1993). Un estudio previo realizado por Martínez-Zepeda (2014) reveló que las cepas CH-7 y PA-18 fueron tolerantes a 42°C mientras que las cepas DI-14 y PA-16 no lo fueron (Martínez-Zepeda, 2014).

El crecimiento celular final de las fermentaciones varió en un rango de 1.33×10^8 cel/mL (cepa DI-14 en mosto de agave a 30°C) a 4.03×10^8 cel/mL (cepa PA-18 en medio de cultivo sintético a 40°C). El crecimiento celular de las cepas fue mayor en las fermentaciones de mosto a 30°C. El crecimiento celular de las 4 cepas estudiadas fue similar. Las diferencias en la cantidad de células al final de la fermentación en los diferentes tratamientos se pueden atribuir a los factores fisiológicos de cada cepa como capacidad fermentativa y condiciones de estrés (Martínez-Zepeda, 2014; Alves da Silva, 2005).

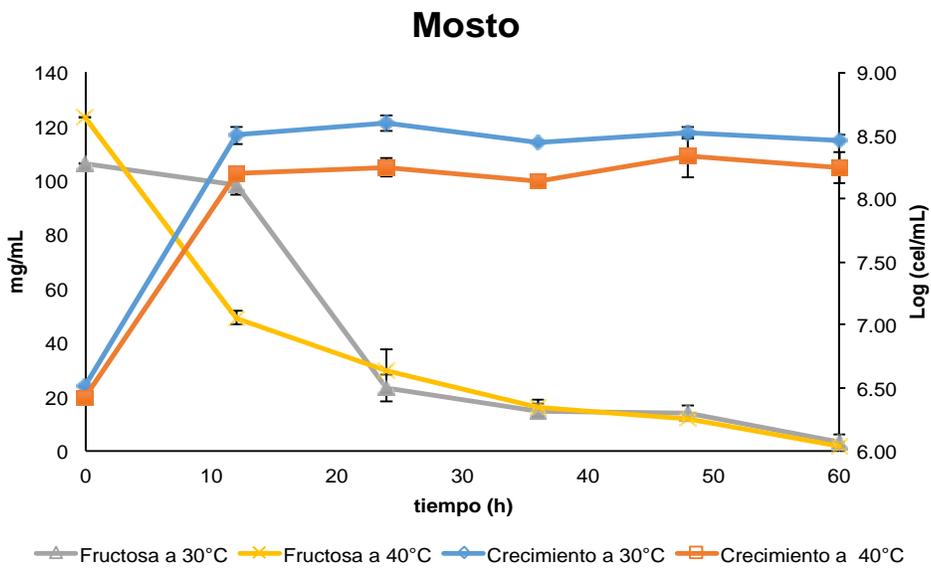
La disminución en la producción de biomasa puede deberse al efecto inhibitorio que tiene la acumulación de etanol en la célula, se ha reportado que la toxicidad celular del etanol es mayor a altas temperaturas (Nagodawithana, 1974) alterando la estructura de la membrana y como consecuencia disminuyendo su funcionalidad debido a la desnaturalización de proteínas (Singer y Lindquist, 1998).

También es importante considerar que la temperatura de fermentación para la elaboración del mezcal en Oaxaca oscila entre 25°C y 30°C. Las cepas están adaptadas a dichas temperaturas lo cual a ser sometidas a 40°C podrían estar en condiciones de estrés (Martínez-Zepeda, 2014).

a)

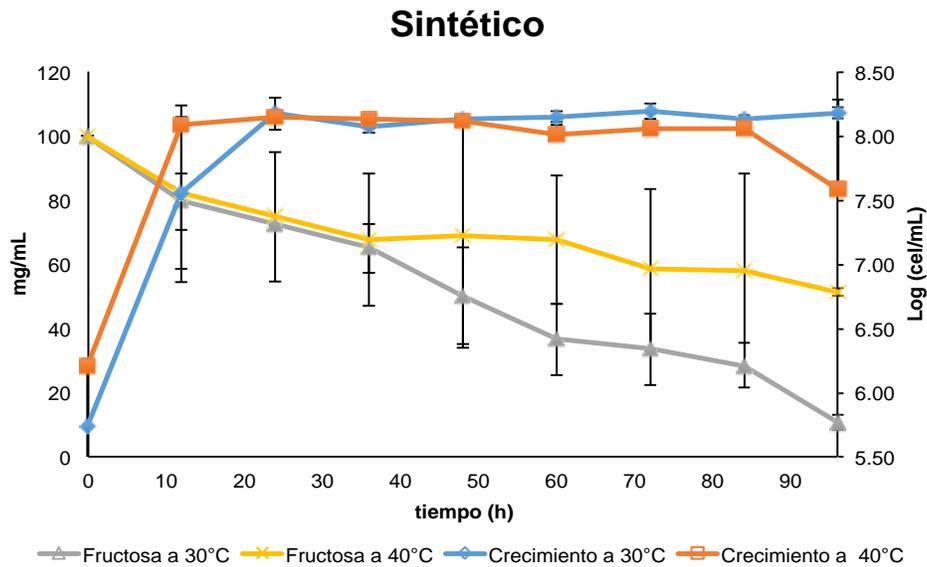


b)

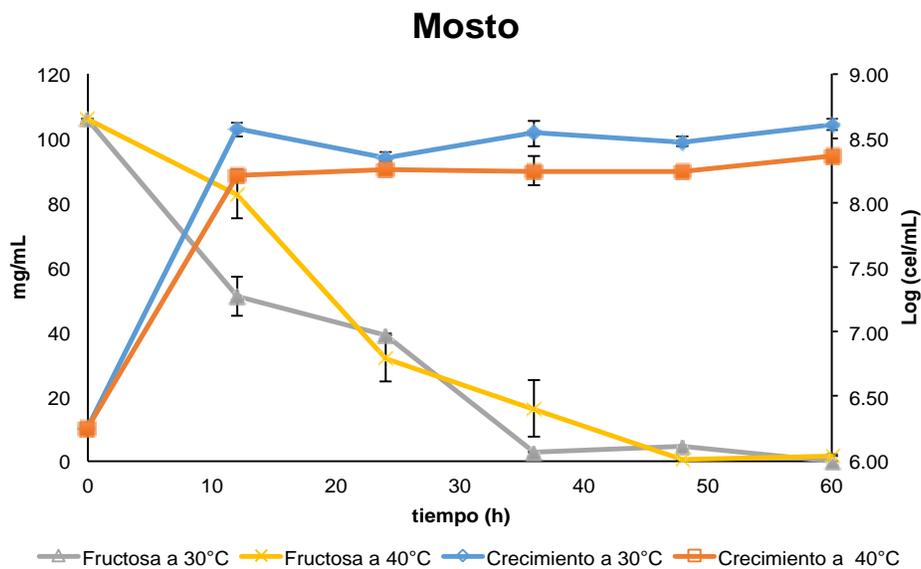


Gráfica 1. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de *A. angustifolia* (b) empleando la cepa CH-7. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

a)

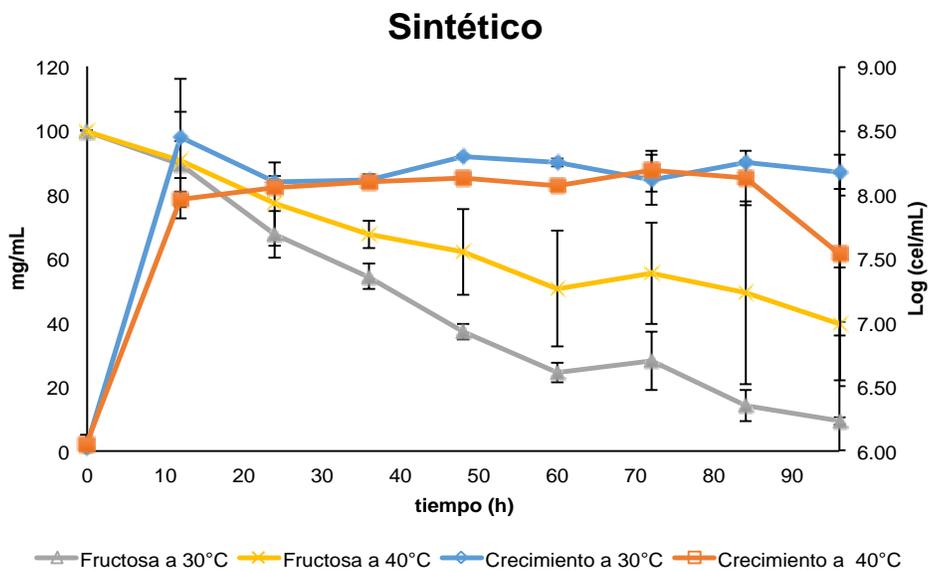


b)

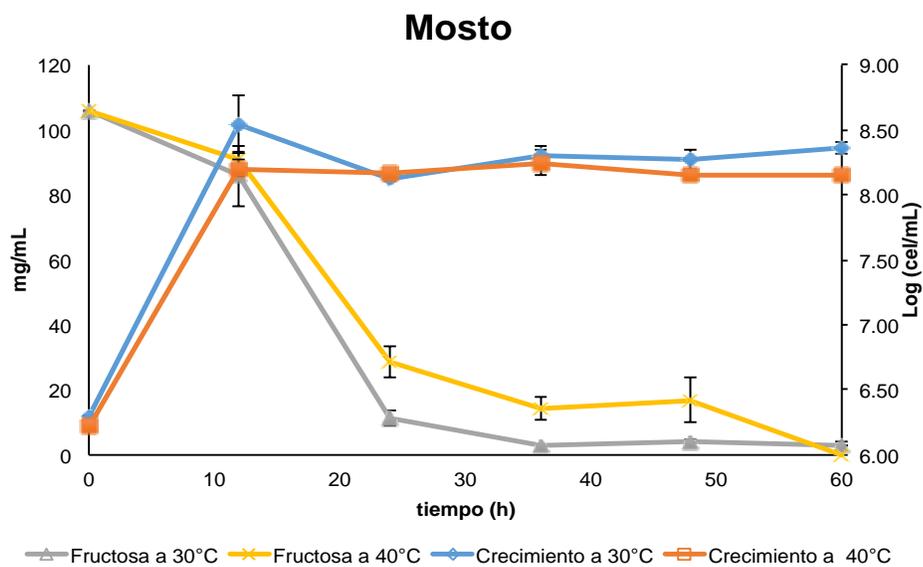


Gráfica 2. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético (a) y en mosto de *A. angustifolia* (b) empleando la cepa DI-14. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

a)

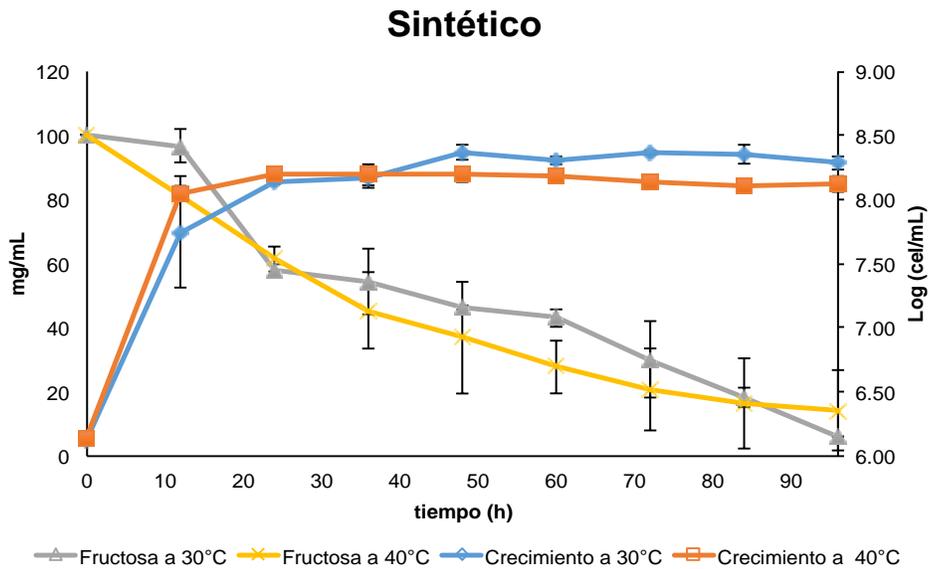


b)

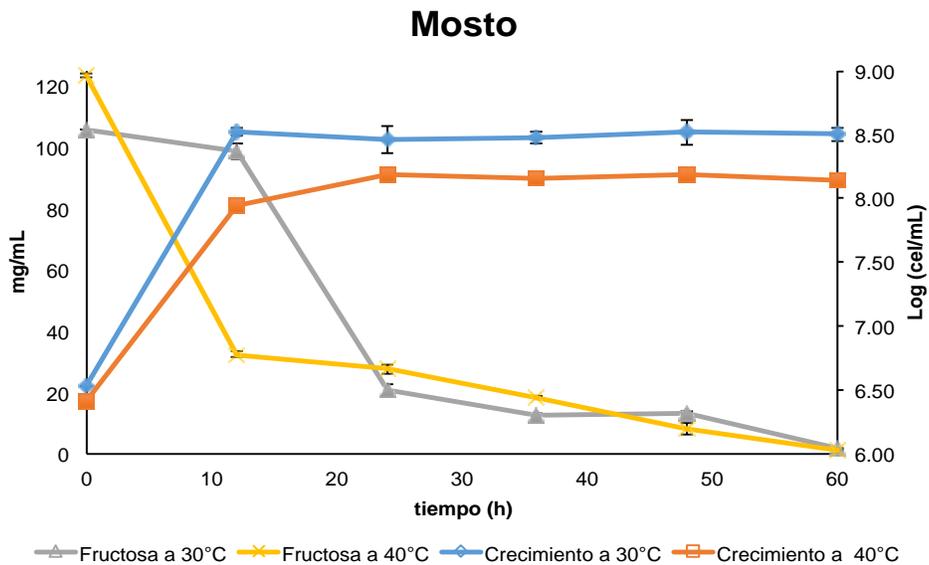


Gráfica 3. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético **(a)** y en mosto de *A. angustifolia* **(b)** empleando la cepa PA-16. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

a)



b)



Gráfica 4. Comportamiento cinético de la fermentación de fructosa a diferentes temperaturas en medio sintético **(a)** y en mosto de *A. angustifolia* **(b)** empleando la cepa PA-18. Los puntos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

Producción de ácidos orgánicos

En la Tabla 4 se observa que la producción de ácido láctico fue muy baja en el último día de fermentación; su concentración no excede de 0.04 ppm, incluso en algunos de los tratamientos no fue detectado. Por ejemplo, las cepas CH-7 y DI-14 en medio de cultivo sintético, PA-16 y PA-18 en los tratamientos en mosto y medio sintético a 40°C, respectivamente, no se detectó la presencia de ácido láctico. Las cepas de levaduras no generan ácido láctico ni acético como productos principales de sus vías metabólicas, así, la variación del pH en el medio de fermentación fue de 4.5 a 3. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Díaz-Montaña (2008), quienes reportan la ausencia de ácido láctico y acético en fermentaciones realizadas con cepas de *S. cerevisiae* aisladas del mosto de *A. tequilana* Weber. Sin embargo, el ácido acético probablemente no se haya detectado por la generación del producto de equilibrio (acetato de etilo) dada por la presencia de etanol y condiciones ácidas del medio. La baja producción de ácido láctico puede favorecer a las características sensoriales del producto final.

Producción de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles principales reportados durante la fermentación de *S. cerevisiae* en mosto de agave y medio sintético son los siguientes: alcoholes superiores (n-propanol, n-butanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico y 2-fenil etanol); ésteres (acetato de etilo); aldehídos; metanol y etanol (Díaz-Montaña, 2008; De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Segura-García, 2014). En la Tabla 4 se presentan las concentraciones de los compuestos volátiles: acetato de etilo, etanol, n-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (alcoholes amílicos), también la presencia de un ácido orgánico (ácido láctico).

Tabla 4. Concentración de los principales compuestos volátiles y un ácido orgánico en el último día de fermentación.

Tratamientos	Acetato de etilo (ppm)	Etanol (%v/v)	n-propanol (ppm)	2-metil-1-propanol (ppm)	2-metil-1-butanol (ppm)	3-metil-1-butanol (ppm)	Ácido láctico (ppm)
CH-7 S 30°C	37.57±0.64 ^f	5.61±0.40 ^h	3.90±0.78 ^a	47.89±4.34 ^f	8.98±0.01 ^{de}	52.58±0.78 ^f	nd ^a
CH-7 M 30°C	55.22±2.34 ^h	2.38±0.03 ^{abc}	11.26±1.47 ^{cde}	50.43±6.33 ^f	5.85±1.11 ^{bc}	47.54±10.76 ^{ef}	0.04±0.00 ^c
CH-7 S 40°C	12.89±2.78 ^b	4.30±0.35 ^{fg}	5.25±1.30 ^{abc}	31.54±0.00 ^d	8.16±0.40 ^{bcde}	42.04±3.73 ^{ef}	nd ^a
CH-7 M 40°C	17.18±1.70 ^{cd}	4.66±0.05 ^g	13.90±1.04 ^e	12.23±0.55 ^{bc}	2.75±0.11 ^a	15.35±0.02 ^a	0.03±0.00 ^b
DI-14 S 30°C	1.58±0.04 ^a	4.22±0.06 ^{fg}	5.00±1.99 ^{ab}	9.80±3.39 ^{abc}	10.10±3.45 ^e	43.74±10.39 ^{ef}	nd ^a
DI-14 M 30°C	2.68±0.56 ^a	2.51±0.07 ^{abcd}	11.63±0.61 ^{de}	11.83±1.72 ^{abc}	2.09±0.98 ^a	21.60±3.90 ^{ab}	0.035±0.1 ^{bc}
DI-14 S 40°C	31.15±2.66 ^e	2.70±0.05 ^{bcd}	2.86±0.18 ^a	15.95±8.99 ^c	8.27±1.44 ^{cde}	35.84±5.79 ^{cde}	nd ^a
DI-14 M 40°C	0.52±0.18 ^a	1.83±0.26 ^a	10.47±1.73 ^{bcde}	6.08±1.67 ^{ab}	1.86±0.11 ^a	24.05±5.07 ^{abc}	0.035±0.00 ^{bc}
PA-16 S 30°C	0.91±0.12 ^a	3.18±0.23 ^{de}	32.31±10.42 ^f	7.37±1.29 ^{ab}	7.57±1.86 ^{bcde}	38.96±7.93 ^{de}	nd ^a
PA-16 M 30°C	1.54±0.35 ^a	3.19±0.01 ^{de}	11.63±0.78 ^{de}	6.65±0.87 ^{ab}	0.49±0.11 ^a	16.26±3.13 ^a	0.03±0.01 ^b
PA-16 S 40°C	14.99±1.07 ^{bc}	2.23±0.08 ^{ab}	2.86±0.35 ^a	11.18±2.44 ^{abc}	7.10±0.98 ^{bcd}	29.52±0.47 ^{bcd}	nd ^a
PA-16 M 40°C	0.93±0.47 ^a	2.40±0.28 ^{abc}	8.75±2.09 ^{abcde}	4.32±1.67 ^a	1.20±0.74 ^a	20.68±5.20 ^{ab}	0.03±0.00 ^b
PA-18 S 30°C	41.17±2.54 ^{fg}	4.91±0.98 ^{gh}	3.17±0.26 ^a	39.91±2.02 ^e	7.09±0.83 ^{bcd}	38.91±0.54 ^{de}	nd ^a
PA-18 M 30°C	44.70±0.87 ^g	2.96±0.25 ^{bcde}	12.68±1.04 ^e	51.24±4.24 ^f	5.51±0.36 ^b	38.62±7.89 ^{de}	0.04±0.00 ^c
PA-18 S 40°C	14.41±5.00 ^{bc}	3.61±0.00 ^{ef}	5.74±2.69 ^{abcd}	32.94±4.76 ^{de}	8.32±1.90 ^{cde}	42.44±9.07 ^{ef}	nd ^a
PA-18 M 40°C	19.12±0.95 ^d	3.94±0.50 ^f	12.61±0.61 ^e	12.60±0.03 ^{bc}	2.79±0.14 ^a	15.44±0.59 ^a	0.03±0.00 ^b

Los datos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos. La comparación de medias se realizó para el mismo metabolito analizado entre tratamientos. Los valores acompañados con la misma letra como superíndice significa que no hay diferencia significativa (LSD de Fisher $p \leq 0.005$). nd: no detectado. En los tratamientos se indica la cepa, medio de cultivo: medio de cultivo sintético (S) y mosto (M) y temperatura: 30°C y 40°C.

La fermentación del mosto a 30°C empleando la cepa CH-7 presentó la mayor producción de acetato de etilo con una concentración de 55.22±2.34 ppm (Tabla 4). Esta concentración presenta diferencia estadísticamente significativa con los valores de las concentraciones de acetato de etilo producidos por las cepas DI-14, PA-16 y PA-18 bajo todas las condiciones. Cabe destacar que en las fermentaciones en mosto empleando las cepas CH-7 y PA-18 se presentó mayor producción de acetato de etilo que en fermentaciones con medio de cultivo sintético. Mientras que las cepas DI-14 y PA-16 fue variable. Por otro lado, las fermentaciones realizadas a temperatura de 30°C se produjo mayor concentración de acetato de etilo, excepto las cepas DI-14 y PA-16 en medio sintético. Las temperaturas mayores a 30°C favorecen la evaporación de acetato de etilo (Molina, 2007).

El éster más abundante reportado en el mezcal es el acetato de etilo (De León-Rodríguez, 2008). Díaz-Montaña (2007) reportó que las cepas de *S. cerevisiae* produjeron entre 8.7±1.2 y 4.0±0.5 ppm de acetato de etilo en mosto de *Agave tequilana* a 35°C. De esta manera, las cepas CH-7 (55.22±2.34 ppm) y PA-18 (44.70±0.87 ppm) produjeron las mayores cantidades de acetato de etilo en mosto de agave, lo cual indica que su presencia en la fermentación del mezcal contribuye a proporcionar sabores afrutados intensos. El éster es producido intracelularmente como resultado de la condensación de éster de Coenzima A de ácidos grasos con alcoholes. La reacción es catalizada por una alcohol aciltransferasa (Saerens, 2009). La concentración de acetato de etilo depende de la cepa de levadura empleada, por ejemplo, las levaduras de cervezas tipo ale tienen una concentración de 27 ppm y las cervezas tipo lager tienen 82 ppm (Santillan-Valverde & García-Garibay, 1998).

En la Tabla 5 se muestra la concentración de etanol expresada en %v/v. La cepa CH-7 en medio sintético a 30°C tuvo mayor concentración de etanol con 5.61±0.40 %v/v y no presentó diferencia estadísticamente significativa con el valor de la concentración de etanol producido por la cepa PA-18 (4.91±0.98 ppm) bajo las condiciones antes mencionadas. Las diferencias entre las demás cepas en los tratamientos es normal ya que cada cepa tienen características fisiológicas diferentes y las condiciones de temperatura y medio de cultivo no fueron las óptimas para cada cepa. Romano (2003)

reportó diferencias en la producción de etanol, entre la misma especie de *S. cerevisiae*, están relacionadas con la composición del medio de cultivo y a las condiciones ambientales.

La mayoría de las cepas tuvieron mayor producción de etanol en medio de cultivo sintético que en mosto de agave. Las cepas de *S. cerevisiae* tienen la facultad de consumir el sustrato disponible y transformarlo en etanol. Al utilizar un medio de cultivo sintético se puede dirigir la fermentación alcohólica y favorecer la producción de etanol. En cambio, el mosto es un medio de cultivo complejo en donde hay presencia de otros compuestos como: ácidos grasos, furfurales y terpenos que pueden afectar en la activación de la ruta metabólica para la producción de etanol.

La mayoría de las cepas produjeron mayor cantidad de etanol a 30°C que a 40°C. Entre mayor sea la temperatura el etanol se puede volatilizar, así mismo, las células pueden entrar en estrés provocando daño celular. En respuesta a las condiciones de estrés las células ajustan su metabolismo activando otras vías y como consecuencia la producción de otros metabolitos como glicerol, ácido acético, etc. (Torija, 2003).

La fermentación en medio de cultivo sintético a 30°C utilizando la cepa PA-16 se destacó por la producción de n-propanol en mayor concentración (32.31 ± 10.42 ppm) y fue estadísticamente diferente a todas las cepas. Resultados similares fueron reportados por Díaz-Montaño (2007), empleando cepas de *S. cerevisiae* y obteniendo una concentración de n-propanol que varió en el rango de 30.9 ± 1.1 y 15.0 ± 1.0 ppm usando mosto de *Agave tequilana* a 35°C. La formación de n-propanol por la vía Ehrlich usa como base el aminoácido treonina, que en el medio sintético, la fuente provino del extracto de levadura y del mosto de las aminoácidos provenientes de la piña (0.03%) (Lanchenmeier *et al*, 2006; Bautista-Justo, 2001). Podemos decir que la cepa PA-16 tiene propiedades fisiológicas que favorecen el metabolismo de aminoácidos bajo esas condiciones de medio de cultivo y temperatura (30°C en el medio de cultivo sintético).

El efecto de la temperatura en la producción de n-propanol fue variable en cada cepa. Las cepas CH-7 y PA-18 tuvieron mayor producción de n-propanol a 40°C que a 30°C, y estadísticamente (LSD de Fisher 95%) no hubo diferencia significativa entre estas dos cepas de levaduras. Las cepas DI-14 y PA-16 tuvieron un comportamiento contrario a las

cepas anteriores, es decir, presentaron mayor producción a 30°C que a 40°C. Sin embargo, se encontró que las cepas DI-14 y PA-16 tuvieron diferencia significativa entre ellas. En las cepas de *S. cerevisiae* no se ha observado que la temperatura tenga influencia en la concentración de este metabolito (Erten, 2002). En relación al tipo de medio de cultivo, todas las cepas presentaron mayor producción de n-propanol en mosto de agave, excepto la cepa PA-16. Esto se debe al tipo de cepa y la relación de carbono y nitrógeno que cada cepa requiera .

En las fermentaciones llevadas a cabo en mosto a 30°C empleando las cepas PA-18 y CH-7 presentaron mayor producción de 2-metil-1-propanol con 51.24±4.24 ppm y 50.43±6.33 ppm, respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellas. La producción 2-metil-1-propanol está influenciada por la temperatura y por el tipo de cepa. Cada cepa presentó mejor producción de 2-metil-1-propanol a determinadas condiciones. Por ejemplo, las cepas CH-7 y PA-18 produjeron más 2-metil-1-propanol a 30°C que a 40°C y la cepa DI-14 produjo más a 40°C que a 30°C. En las fermentaciones con la cepa PA-16 no se observó que la producción 2-metil-1-propanol fuera mayor a determinada temperatura pero si observó que la cepa depende del tipo de medio de cultivo. En relación al tipo de medio de cultivo la cepa CH-7 tuvo mayor producción en mosto que en medio de cultivo sintético y la cepa PA-16 tuvo mayor producción de 2-metil-1-propanol en medio de cultivo sintético que en mosto. Mientras que en las cepas DI-14 y PA-18 no se observó una tendencia con respecto al tipo de medio de cultivo. Segura-García (2014) comparó la producción de 2-metil-1-propanol de cepas de *S. cerevisiae* aisladas del tequila en medio de cultivo sintético y en jugo de agave a 30°C, en donde se obtuvo mayor producción de 2-metil-1-propanol en medio sintético (20.46±0.32 ppm) que en jugo de agave (14.00±4.05 ppm) y concluyó que el factor principal que influye en la producción de 2-metil-1-propanol es el tipo de cepa empleada. La generación de 2-metil-1-propanol es una consecuencia de la activación del metabolismo de aminoácidos por la vía Ehrlich. El 2-metil-1-propanol proviene del esqueleto del aminoácido valina (Albers, 1998).

La cepa DI-14 en el medio de cultivo sintético a 30°C, la producción de 2-metil-1-butanol fue de 10.10±3.45 ppm. En general, se observó que en las fermentaciones realizadas en

medio de cultivo sintético, a mayor temperatura menor concentración de 2-metil-1-butanol, a excepción de las cepas PA-16 en mosto y PA-18 en medio sintético.

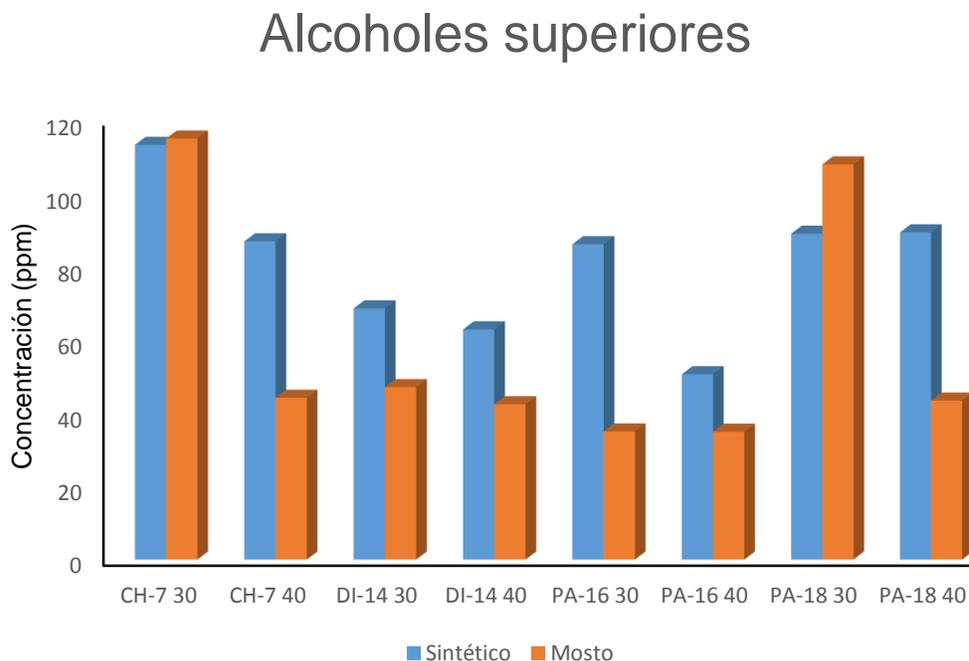
Por otro lado, la producción de 3-metil-1-butanol también fue evaluada. En la fermentación realizada en medio sintético a 30°C usando la cepa CH-7 se presentó mayor concentración de 3-metil-1-butanol con 52.58 ± 0.78 ppm entre todos los tratamientos. Las fermentaciones en medio de cultivo sintético presentaron mayor producción de éste alcohol. Por otro lado, no se observó tendencia en relación a la temperatura. De igual manera que su isómero, 2-metil-1-propanol, el factor principal en la producción de 3-metil-1-propanol se debió al fenotipo de cada cepa (Segura-García, 2014).

La formación de los isómeros del alcohol amílico (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) es a través de dos posibles rutas: por la desaminación de leucina e isoleucina (vía Ehrlich) o por los intermediarios en la biosíntesis de estos aminoácidos. Arrellano (2008) reportó que esta última ruta puede ser la vía principal de la producción de alcohol amílico, ya que el jugo de agave no es rico en leucina e isoleucina ya que la formación de alcohol amílico ocurrió después de las *S. cerevisiae* empezó a crecer, cuando los aminoácidos eran activamente necesarios.

Arrellano (2007) demostró que el factor más importante en la producción de 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol fue el tipo de cepa de *S. cerevisiae*. Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas del mosto de tequila produjeron mayor cantidad de 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol que las cepas de levadura de panadería ya que las levaduras provienen de condiciones naturales diferentes y como consecuencia los perfiles metabólicos reflejan la adaptación en el medio ambiente de donde son procedentes. Así mismo, concluyó que el balance de carbono y nitrógeno tiene influencia en la producción de estos alcoholes. En mostos de tequila, se encontró que cuando la relación de carbono/nitrógeno era baja, la producción de alcoholes superiores fue baja (19 mg/L en levadura de panadería y 30 mg/L para la cepa nativa del tequila) y cuando la relación fue alta, se observó una producción de alcohol superior (27 mg/L y 64 mg/L, respectivamente).

La fermentación en mosto a 30°C con la cepa CH-7 produjo mayor cantidad de alcoholes superiores con 115.00 ppm. Seguido de esta misma cepa pero en medio de cultivo

sintético a 30°C produjo 113.35 ppm de alcoholes superiores. La capacidad de metabolizar las fuentes de nitrógeno y transformarlos en alcoholes superiores fue mejor con la cepa CH-7. En los tratamientos con la cepa PA-18 a 30°C, también se obtuvo mayor cantidad de alcoholes superiores, con una producción de 89.07 ppm en medio sintético y 108.03 ppm en mosto. Podemos distinguir que ambas cepas produjeron mayor cantidad de alcoholes superiores en el mosto que en medio sintético, mientras que, las demás cepas DI-14 y PA-16 se observó lo contrario (Gráfica 5).



Gráfica 5. Concentración de alcoholes superiores, suma de alcoholes: n-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.

Las concentraciones aromáticas de todas la levaduras estudiadas en este trabajo se compararon con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana del mezcal (NOM-070-SCFI-1994). La producción de alcoholes superiores de todas la cepas están por debajo de rango permitido. La concentración máxima fue de la cepa CH-7 con 11.50 mg/100 mL y de acuerdo con en la especificaciones el mínimo debe estar entre 100.00 a 400 mg/100mL lo cual demuestra que las cepas de *S. cerevisiae* son seguros y pueden

utilizarse en el proceso del mezcal. Sin embargo, es muy importante considerar que no se realizó la etapa de destilación que involucra la separación y concentración de alcoholes y otros compuestos volátiles por lo tanto no podemos concretar si este cumple con las especificaciones ya que no se considera como producto terminado.

El metanol es otro compuesto que está establecido en la Norma Oficial Mexicana del mezcal (NOM-070-SCFI-1994). En este estudio no se detectó producción de metanol, por lo cual, se garantiza la seguridad del consumidor.

Rendimientos

En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$), productividad y rendimiento.

Los resultados permitieron evaluar las diferencias metabólicas de las cepas aisladas de *S. cerevisiae* en términos de su capacidad de consumo de fructosa y producción de etanol. El rendimiento de etanol fue mayor en medio sintético que en mosto de *Agave angustifolia*, destacando la cepa CH-7 en medio sintético a 30°C con el 86.58% de rendimiento de etanol. Cabe mencionar que solo se consumió el 97.51% del sustrato. Por lo tanto, el rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$) fue el más alto con 0.45 g/g.

En relación con la productividad, la cepa CH-7 tuvo los valores de productividad más altos destacando en el tratamiento en mosto a 40°C con 0.61 g de producto/Lh.

Tabla 5. Porcentajes de consumo de fructosa, $Y_{p/s}$, productividad y rendimiento en las fermentaciones.

Tratamientos	% Consumo de fructosa	Rendimientos		
		$Y_{p/s}$ (g/g)	Productividad (g de producto/L h)	Rendimiento %
CH-7 S 30	97.51	0.45	0.46	86.58
CH-7 M 30	96.93	0.15	0.31	37.67
CH-7 S 40	84.98	0.40	0.35	66.34
CH-7 M 40	98.69	0.27	0.61	56.28
DI-14 S 30	89.28	0.37	0.35	65.13
DI-14 M 30	100.00	0.15	0.33	35.51
DI-14 S 40	48.81	0.44	0.22	41.65
DI-14 M 40	98.38	0.10	0.24	25.89
PA-16 S 30	90.61	0.28	0.26	49.08
PA-16 M 30	97.28	0.21	0.42	45.14
PA-16 S 40	60.52	0.29	0.18	34.42
PA-16 M 40	91.38	0.16	0.32	33.96
PA-18 S 30	94.22	0.41	0.40	75.78
PA-18 M 30	98.37	0.19	0.39	41.88
PA-18 S 40	95.74	0.30	0.30	55.71
PA-18 M 40	99.00	0.22	0.52	47.91

En los tratamientos se indica la cepa, medio de cultivo: medio de cultivo sintético (S) y mosto (M) y temperatura.

En el tratamiento con la cepa DI-14 en mosto a 30°C el sustrato se consumió totalmente, sin embargo, el rendimiento en la producción de etanol fue de 35.51%. Es decir, no todo el sustrato se transformó en etanol. Su rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$) fue de los más bajos con 0.15 g/g. Probablemente, ésta cepa utilizó el sustrato para el crecimiento celular. Probablemente, la cepa utilizó el sustrato como mecanismo de producción de biomasa y no de metabolitos.

CONCLUSIONES

- Se determinó que las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* producen los principales compuestos volátiles; acetato de etilo, etanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, en jugo de *Agave angustifolia* y en medio sintético en las dos condiciones de temperatura. Sin embargo, la concentración de estos fueron diferentes entre cada cepa.
- Todas las cepas tuvieron un porcentaje de rendimiento de etanol mayor en medio sintético a una temperatura de 30 °C. La cepa CH-7 a 30°C en medio sintético presentó mayor producción de etanol (86.55 % de rendimiento).
- La concentración de compuestos volátiles se ven favorecidos por la disminución de temperatura. Sin embargo, la concentración individual de los alcoholes y del acetato de etilo, mostraron diferencias estadísticamente significativas (LSD de Fisher $p \leq 0.005$) entre cepa, temperatura y medio de cultivo.
- La cepa CH-7 presentó mayor producción de compuestos volátiles seguida de la cepa PA 18, en mosto a una temperatura de 30°C.
- La composición de los medios de cultivo sintético y mosto dan lugar a diferentes perfiles metabólicos de las cepas con respecto a la concentración de los 6 compuestos volátiles evaluados.

PERSPECTIVAS

La caracterización de las cepas *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del mezcal de Oaxaca, con respecto a la producción de sus compuestos volátiles principales realizado en este trabajo, puede tener un valor práctico para impulsar el desarrollo tecnológico en la producción del mezcal que pueden tomarse en consideración para elaboración de especificaciones particulares y públicas para la producción de esta bebida alcohólica. Así mismo identificar cepas que sean distintivas de cada región productora de Mezcal y proponer cepas cuyo metabolismo sea redituable para: la producción, la calidad sanitaria y sensorial del producto terminado.

En la actualidad, la comercialización de mezcal nacional e internacional han aumentado por lo cual es necesario impulsar la innovación y desarrollo tecnológico para adaptarse a las demandas y exigencias de los consumidores ofreciendo calidad y prestigio al mezcal, beneficiando la tradición y la economía de los productores del mezcal.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición del medio sintético (Segura–García, 2014).

Para preparar 1 litro:

Fructosa 100 g

Fosfato ácido de potasio 2.2 g

Extracto de levadura 1 g

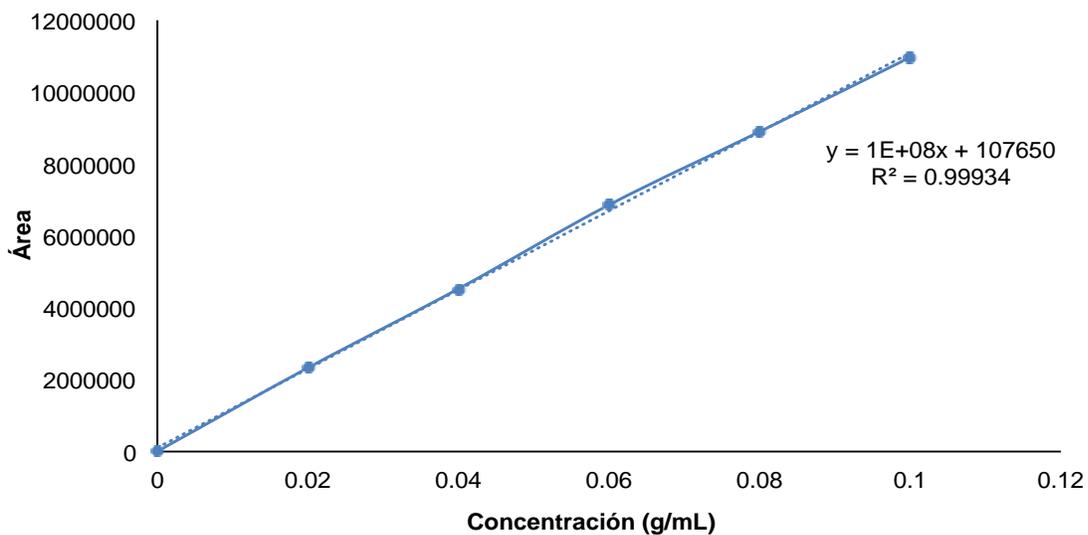
Sulfato de magnesio heptahidratado 1g

Nitrato de calcio 0.93

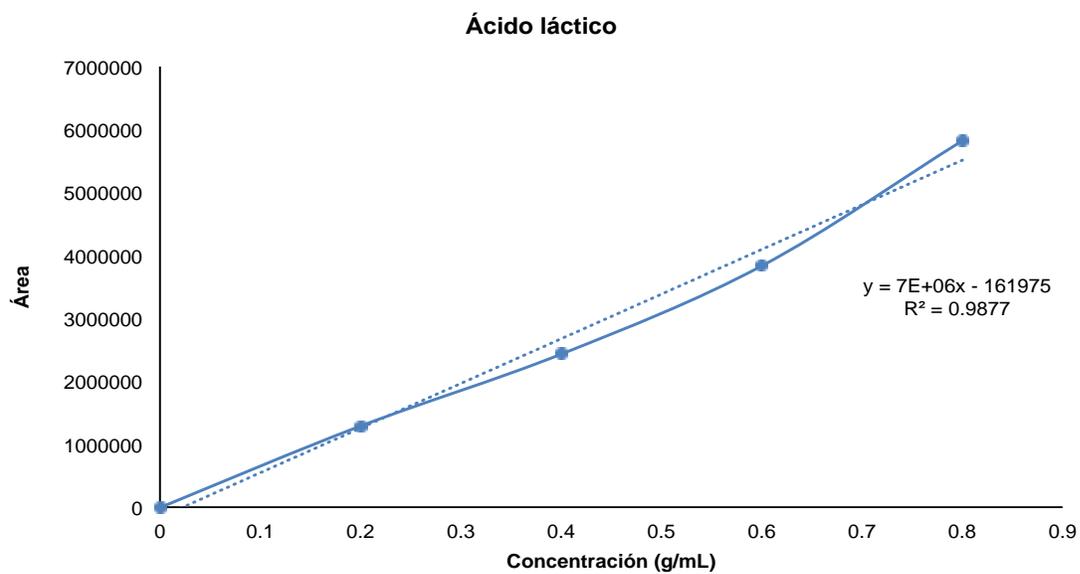
ANEXO 2. Tiempos de retención de los compuestos volátiles y ácido orgánico y curvas de calibración fructosa, ácido láctico, acetato de etilo y alcoholes.

Compuesto		Tiempo de retención (min)
Acetato de etilo 99.8%	Sigma Aldrich	5.74
Etanol 9	Sigma Aldrich	7.17
n-propanol 99.5 %	Sigma Aldrich	10.29
2-metil-propanol 99.5 %	Sigma Aldrich	11.99
2-metil-butanol 99%	Sigma Aldrich	15.65
3-metil-butanol 99%	Sigma Aldrich	15.72
ácido láctico ^a		12.35

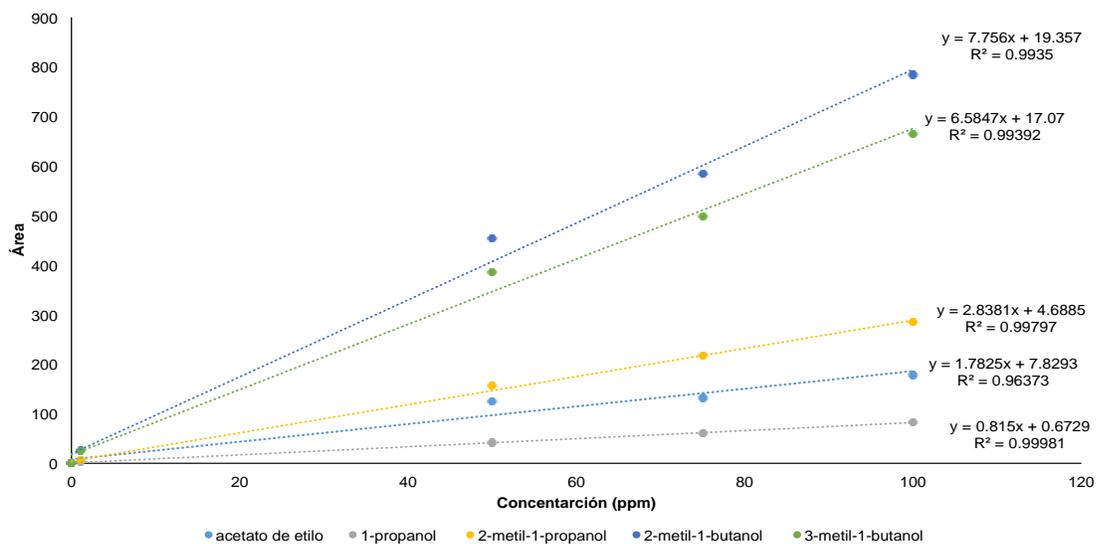
^aHPLC



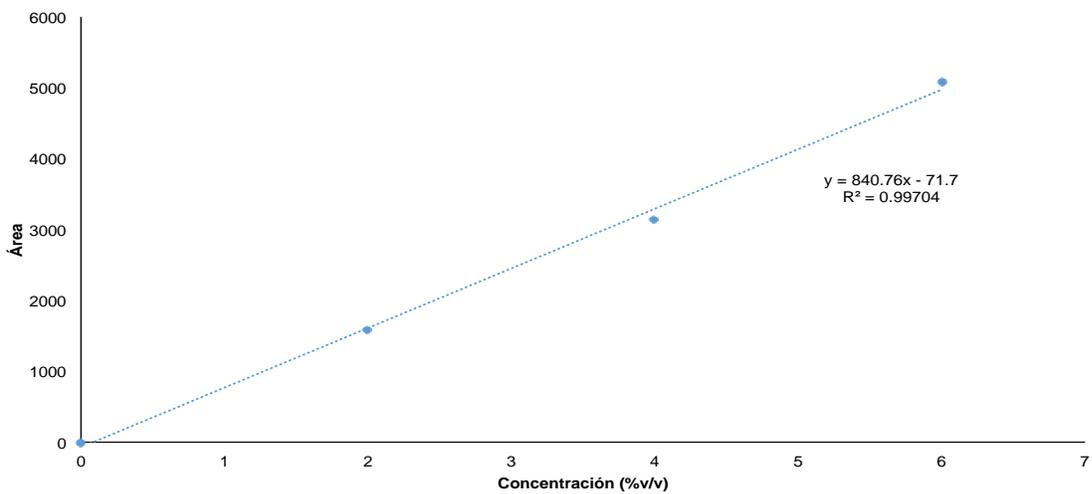
Gráfica 6. Curva patrón de fructosa por patrón externo



Gráfica 7. Curva patrón de ácido láctico por patrón externo



Gráfica 8. Curva patrón de acetato de etilo y de alcoholes superiores por patrón externo.



Gráfica 9. Curva patrón de etanol por patrón externo.

ANEXO 3. Cálculos de porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$), productividad y rendimiento de formación de producto.

Los rendimientos y la productividad fueron calculados de la siguiente manera:

% Consumo de fructosa

$$\%Consumo\ de\ fructosa = \frac{g_i - g_f}{g_i} * 100$$

Ejemplos:

CH-7 en medio de cultivo sintético a 30°C

$$\%Consumo\ de\ fructosa = \frac{25g - 0.62g}{25g} * 100 = 97.51\%$$

CH-7 en mosto de agave a 30°C

$$\%Consumo\ de\ fructosa = \frac{26.41g - 0.81g}{26.41g} * 100 = 96.93\%$$

Rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$)

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} = \frac{g\ producto}{g\ sustrato\ consumido}$$

Ejemplos:

DI-14 en medio de cultivo sintético a 30°C

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{8.32g - 0g}{25g - 2.68g} = 0.37\ g$$

DI-14 en mosto de agave a 30°C

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{4.95g - 0.96g}{26.47g - 0.81g} = 0.15g$$

Productividad .

$$Productividad = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{Pf - Pi}{tf - ti} = \frac{g \text{ producto}}{L * h}$$

Ejemplos:

CH-7 en medio de cultivo sintético a 40°C

$$Productividad = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{33.97g - 0g}{96h - 0h} = 0.35 \frac{g}{L * h}$$

CH-7 en mosto de agave a 40°C

$$Productividad = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{36.77g - 0g}{60h - 0h} = 0.61 \frac{g}{L * h}$$

Rendimiento de etanol

$$Rendimiento \text{ de etanol} = \frac{g \text{ de etanol producido exp.}}{g \text{ de etanol teórico}} * 100$$

DI-14 en medio de cultivo sintético a 40°C

$$Rendimiento \text{ de etanol} = \frac{5.33g}{12.78g} * 100 = 41.65$$

DI-14 en mosto a 40°C

$$Rendimiento \text{ de etanol} = \frac{3.61g}{13.93g} * 100 = 25.89$$

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar–Uscanga, B., Arrizon, J., Ramírez, J., & Solís–Pacheco, J. (2007). Effect of Agave tequilana juice on cell wall polysaccharides of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins. *Antoine Leeuwenhoek* , 91 (2), 151–157.

Aguirre–Rivera, R. J. (2001). *El Maguey Mezcalero Potosino*. México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Albers, E. (1998). Anaerobic redox balance and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Research Development of Microbiology* , 2, 253–279.

Andrade, O. (2006). *Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8S-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la Región de Sola de Vega Oaxaca. Tesis de maestría*. D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Arellano, M. G. (2011). Major volatile compounds analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS). *International Technology. Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications International Technology.* , 73–88.

Arrizon, J., Arizaga J., Hernandez R., Estarron, M., & Gschaedler, A. (2007). Production of volatile compounds in tequila and raicilla musts by different yeasts isolated from Mexican agave beverages. *Hispanic Foods Chemistry* . American Chemical Society, 946, 167–177.

Arrizon, J., Fiore, C., Acosta, G., Romano, P., & Gschaedler, A. (2006). Fermentation behavior and volatile compounds production by agave and grape must yeast in high sugar Agave tequilana and grape must fermentations . *Antoine van Leeuwenhoek* , 8, 181–189.

Bautista-Justo, M., García-Oropeza L., Barboza-Corona J. E., & Parra Negrete L. A. (2001). El agave tequilana Weber y la producción de tequila. Universidad de Guanajuato. *Acta Universitaria* , 11, 26–34.

Bautista, J. A. (2008). Estrategias de producción y mercadotecnia del mezcal en Oaxaca. (T. Melchor, Ed.) *El cotidiano*, 23, 148.

Boekhout, T. K., & Kutzman, C. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, 1–81.

Cabib, E., Roh, D.H., Schidt M., Crotti L.B., & Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biology and Chemistry*, 276, 19679–19682.

Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods— world perspective. *Food Research International*, 27 (3), 253–257.

Carmona Salazar, L., Gavilanes Ruíz M., Maya Ampudia V., & Plata Ramos. (2012). *Compendio de Bioquímica*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, Bioquímica, México.

Casey, G.P., & Ingledew, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Microbiology*, 13 (3), 219–280.

Casey, G.P., Magnus, C.A., & Ingledew, W.M. (1984). High gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 639.

Cedeño, M., & Alvarez-Jacobs (1995). *Production of tequila from Agave, Tequila Herradura, S.A. de C.V. Amatitan Jalisco*, México, 225–240.

Chen, E. The Relative Contribution of Ehrlich and Biosynthetic Pathways to the Formation of Fusel Alcohols. (1978). *American Society of Brewing Chemists, Inc.* 39–43.

COMERCAM. (2013). *Consejo Regulador de la calidad del Mezcal*. Recuperado el 4 de junio de 2014, de <http://www.crm.org.mx>

Comité Nacional Sistema Producto Maguey Mezcal, A. (2011). *Monografía del Mezcal*. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial, Financiera Rural.

Cova, C. (2010). *Caracterización molecular de las cepas de Saccharomyces cerevisiae, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. . D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.*

De León-Rodríguez A., González-Hernández L., Barba de la Rosa A. P., Escalante-Minakata P. & López M. G. (2006). Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave Salmiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54 (4), 1337–1341.

De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Barba de la Rosa, A. & Blaschek, H.P. (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from Agave salmiana using response surface methodology. *Chemical Engineering Progress* , 47 (1), 76–82.

Díaz–Montaño, D., Marie–Line, D., Estarrón–Espinosa, M., & Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology* , 42 (7), 608–616.

Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* , 12 (7), 263–270.

Erlend, A., Townsend, J. P., Adams, R. I., Nielsen, K. M., & Taylor, J. W. (2006). Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* , 6 (5), 702–715.

Erten, H. (2002). Relations between elevated temperatures and fermentation behavior of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 18, 373–378.

Escalante-Minakata, P., Blaschek, H.P., Barba de la Rosa, A. P., Santos, L. & De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of Agave salmiana. *Letters in Applied Microbiology* , 46 (6), 626–630.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 49, 329–337.

FAO. (1991). *El consumo de leña en la producción de mezcal. El caso de Santiago Matatlán, Oaxaca*. Obtenido de www.fao.org/docrep/ad096s/AD096S03.htm

Fleet, G., & Heard, G. M. (1993). Yeast: growth during fermentation. In G. H. Fleet (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology Harwood Academic Publishers* , 27–57.

García Mendoza, A. (1998). *Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de Agavaceas y Nolináceas del jardín botánico*. México: Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

García-Soto, M.J., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Rico-Martínez, R., Miranda-López, R., Botello-Álvarez, J. E. (2011). Kinetic Study of the Thermal Hydrolysis of Agave salmiana for Mezcal Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 59 (13), 7333–7340.

Hazelwood, Lucie A. Daran, Jean-Marc, van Maris, Antonius J. A. Pronk, Jack T., & Dickinson, Richard J. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.74, N 8. p. 2259–2266 . *Applied and Environmental Microbiology* , 74 (8), 2259–2266.

INEGI, (2009). *Sistema para la consulta de anuarios estadísticos de Oaxaca 1995-2009*. Recuperado el junio de 2014, de: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/censos/ce2009/calc_CENSAL-municipio.asp.

Jacques, K.A., Lyons, T.P., & Kelsall, D.R. (2003). *The Alcohol Textbook. Alltechnology*. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. Nottingham University Press.

Jones, A. (1994). Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation,. *Applied Environmental Microbiology* , 60, 1048–1051.

- Joslyn, M. (1951). Nutrient requirements of yeast. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 5 (2), 260–276.
- Killian, E., & Ough, C.S. (1979). Fermentation ester–formation ad retention as affected by fermentation temperature. *American Journal of Enologu and Viticulture* , 30, 301–305.
- Kobayashi, Michiko., Hiroshi, Shimizu., & Suteaki, Shioya (2008). Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 106 (4), 317–323.
- Lachenmeier, D., Sohnius, E. M., Atting, R., & López, M. (2007). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54 (11), 3911–3915.
- Lachenmeier, D.W.,Haupt, S., & Schulz, K. (2008). Defining maximum levels of higher alcohols in alcoholic beverages and surrogate alcohol products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* , 50 (3), 313–321.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizon-Gavino, J., Herrera-Suarez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler M.T. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8 (7), 1037–1052.
- Lappe, P., & Ulloa, M. (1993). Microbiología del Pulque. Alimentos fermentados indígenas de México. . *Universidad Nacional Autónoma de México, México* , 75–80.
- Madigan, T., & Parker, J. (2009). *Biología de los microorganismos*. Brock. Pearson Education, 12 Edición, 133–136.
- Mancilla-Margalli, 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, 806–812.
- Mancilla-Margalli, N. A. (2006). Water soluble carbohydrates and frutan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (20), 7832–7839.

Martínez-Gutiérrez, G. A., Zárate Altamirano, G., & Urrestaazu, M. (2012). Maguery bagasse waste: a sustainable substrate in soilless culture by melon and tomato crop. *Journal of Plant Nutrition* , 35, 2135-2144.

Martínez–Aguilar, Juan Fco., Peña–Alvarez, Araceli. (2009). Characterization of Five Typical Agave Plants Used To Produce Mezcal through Their Simple Lipid Composition Analysis by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57 (5), 1933–1939.

Martínez–Zepeda, P. (2014). *Evaluación de la tolerancia a diversas condiciones de estrés y determinación de las diferencias a nivel molecular de cepas de Saccharomyces cerevisiae aisladas de palanques de mezcal en el estado de Oaxaca*. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.

Martínez, M. (1990). *Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero, Agave atrovirens*. Tesis de licenciatura. D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Mathews, C. V. (2002). *Bioquímica 3ª Edición*. Pearson Educación S.A., 501–522.

Meligaard, M. (1975). Flavor chemistry of beer. Part I: Flavor interaction between principal volatiles. *Technical Quarterly, Master Brewers Association of America* , 12, 107–117.

Mignorance-Carzola, L., Clemente-Jiménez, J., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, V., & Rodríguez-Vico, F. (2003). Contribution of different natural yeast to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal Microbiology Biotechnology* , 19 (3), 297–304.

Molina, A.M., Swiegers J.H., Varela C., Pretorius, I.S., & Agosin, E. (2007). Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 77 (3), 675-687.

Moreno, S. (2006). *Variabilidad, citogenética, molecular, morfológica y contenido de azúcares reductores totales en poblaciones silvestres de Agave angustifolia*. Trabajo de tesis de Doctorado . Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos de Origen Vegetal. Hermosillo, Sonora, México.

Nagodawithana, T.W., Castellano, C., & Steinkraus, K.H. (1974). Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* , 28 (3), 383–391.

NOM–070–SCFI–1994. (1997). Norma Oficial Mexicana. Bebidas alcohólicas–Mezcal–Especificaciones.

Pawliszyn, J. (1997). Solid Phase Microextraction (SPME). *The chemical Educator* , 2 (4), 1–7.

Pawliszyn, J., & Arthur, C. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62 (19), 2145–214.

Peña-Álvarez, A., Díaz, L., Medina A., Labastida C., & Capella Santiago, E., (2004). Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatografy A* , 1027 (1–2), 131–136.

Petravić, T. V. (2008). Influence of media composition and temperature on volatile aroma production by various wine yeast strains . *Journal of Food Science* , 26 (5), 376–382.

Pietruszka, M., Pielech–Przybylska, K., & Stanislaw, J. (2010). Synthesis of higher alcohols during fermentation of rye mashes. *Food Chemistry and Biotechnology* , 74, 51–63.

Ramírez-Gama, R. L. (2001). *Manual de prácticas de Microbiología*. D.F., México: Facultad de Química, UNAM, 56–77.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. 186:169–80. . *International Journal of Food Microbiology* , 86 (1), 169–180.

Saerens, MG. S., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2009). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*. 3 (2), 165–177.

Santillan–Valverde, C., & García–Garibay, M. (1998). Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40, 109–119.

Segura-García, L., Taillandier, P., Brandam, C., & Gschaedler, A. (2014). Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *Food Science and Technology*, 60 (1), 284–291.

Silva, S. L. (1999). Tecnificación del proceso de fabricación del mezcal. *Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), OAXACA*.

Singer, M. A., & Lindquist S. (1998). Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo. *Molecular Cell*, Vol. 1 (5), 639–648.

Sistema de Información Básica Municipal del Estado de Oaxaca. (2010). Recuperado el junio de 2014, de <http://www.bieoaxaca.org>.

Steinkraus, K. (1996). Handbook of Indigeneos Fermented Foods. New York, USA: Marcel Dekker.

Suárez Lepe, J. A. (2004). *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*. Madrid, España: Mundi–Prensa, 185–189.

Suárez, J. (2002). Análisis sensorial (vino). Impacto de levaduras y bacterias en los aromas vínicos fermentativos. ETS de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid, 2–4.

Torija, MJ., Beltrán, G., Novo, M., Poblet, M., & Gillamon, JM. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal Food Microbiology*, 85 (1), 127–136.

Valdez, A. V., Garcia, L. S., Kirchmayr, M., Rodríguez, P. R., Esquinca, A. G., Coria, R., & Mathis, A. G. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100 (4), 497-506.

Vallejo, C., & González, C. (1999). Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas Mexicanas* 8, 1-17.

Wacher–Rodarte, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria* , 15 (8).

Waleckx, E. Gschaedler, A., Colonna, Ceccaldi, B., & Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry* , 108, 40–48.