



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Evaluación de la producción de etanol por
Kluyveromyces marxianus en mostos de *Agave
tequilana* Weber**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ALICIA CAMACHO BATALLA



MÉXICO , D.F.

2009



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: Francisco Ruiz Terán

Vocal: Maricarmen Quirasco Baruch

Secretario: Gloria Díaz Ruiz

1er suplente: Karla Mercedes Díaz Gutiérrez

2do suplente: Sandra Paola Sánchez Rodríguez

Laboratorio 321, Edificio "E", Facultad de Química.

Asesor: Dr. Francisco Ruiz Terán

Supervisor Técnico: Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez

Sustentante: Alicia Camacho Batalla

“Cualquier cosa es un camino entre cantidades de caminos. Por eso debes tener siempre presente que un camino es sólo un camino; si sientes que no deberías seguirlo, no debes seguir en él bajo ninguna condición... Pero tu decisión de seguir en el camino o de dejarlo debe estar libre de miedo y de ambición... hazte a ti mismo, y a ti solo, una pregunta, ¿tiene corazón este camino? ... Si tiene, el camino es bueno; si no, de nada sirve. Ningún camino lleva a ninguna parte, pero uno tiene corazón y el otro no. Uno hace gozoso el viaje; mientras lo sigas eres uno con él. El otro te hará maldecir tu vida. Uno te hace fuerte, el otro te debilita.”

Carlos Castaneda.

Eso va a mi Universidad Nacional Autónoma de México, a mi Facultad de Química y a esta tesis por ser un camino con mucho corazón.

Gracias a Dios por todo esto.

Muchísimas gracias a Mamá y Papá por enseñarme con su gran ejemplo que para ser yo, debo hacer todo con amor, y que ello, es un indicador del verdadero éxito en la vida. Gracias también por demostrarme cada día que están conmigo, y que confían en mí; por apoyarme en mis locuras y en mis decisiones serias, y sobretodo por ser los mejores papás del mundo... Los amo.

Gracias hermanos:

Adry: Cada que te veo me admiro de ti, porque lo único que has sabido hacer desde que éramos niñas es ser un muy buen ejemplo. Amo tu dedicación, tu consistencia, tu inteligencia y hasta tu mal humor.

Homero: Me has enseñado con tu descabellado ejemplo a defender mis ideales a pesar de que el mundo entero esté en mi contra. Ser lo que quieres ser le guste a quien le guste. También amo tu mal humor y por supuesto a ti.

Abuelo Guildis: Gracias por compartir tu vida y tu esencia con nosotros muy a tu manera.-"yo por aquí mientras tú por allá."

Abuela Alicia: Gracias por compartir tu nombre conmigo y por hacerme sentir tu consentida.

Gracias a mis sobrinitos Frida y Bruno porque desde el día en que aparecieron en mi vida me enseñaron a ser cariñosa, tolerante y buena tía; también les agradezco sus sonrisas, sus abrazos y sus travesuras y espero algún día vivan la UNAM, porque estar en ella, es lo máximo.

Gracias a mis tíos Nacho, Lulú, Raúl y Mary por ponerle un toque especial a mi vida, por apoyarme siempre en mis locuras y por complementar mi persona con sus maravillosas personalidades.

Gracias a mis primos Pavel y Samuel por ser mis amigos. Siempre hay algo que aprender de ustedes.

Jon: Gracias por hacer mi vida dulce, por compartir mucho más que tu vida conmigo, por ser un gran ejemplo de tolerancia, sencillez y humildad; también te agradezco que día a día des lo mejor de ti para que yo sea feliz a cambio de nada. Te amo.

A mis amigas Caro, Jessy y Jail les agradezco todos y cada uno de los momentos que han vivido a mi lado, gracias por convertirse en miembros de mi familia, por ayudarme a deshacer y rehacer nuestro mundo con sonrisas, llanto, amor, comprensión, desesperación y con muchas aventuras.

Peter y Pancho sólo ustedes han podido demostrarme que para ser un excelente amigo, no es necesario estar de cuerpo presente. Siempre están a mi lado cuando los necesito dándome lo mejor de ustedes. Nunca los cambiaría por nada. Los quiero muchísimo.

Mil gracias Pancho, trabajar contigo fue un placer. Siempre te estaré agradecida por haberme dado un proyecto tan divertido; gracias por confiar en mí y por tenerme tantísima paciencia. También gracias por platicar horas y horas conmigo hasta hacerme sentir tranquila.

Gracias a Lil, Sol, Cris, Angel, Christian (pécoro), Aarón y Marco por hacerme la facultad más divertida de lo que era y por ser la pura fiesta.

Agradezco a mi queridísima Claudia (conejito) por apoyarme en el 321, por ser mi cómplice y por ser tan auténtica.

Gracias también a Edna, Betty, Paola, Gilda, Martha, Bere, Kika, Ulises y Christian Orendain por ser los mejores compañeros que he tenido en toda mi vida académica.

Gracias a todos mis compañeros del 321 por aguantarme, y por hacer que mis días de laboratorio estuvieran llenos de alegría, pero quiero agradecer especialmente a Rafa por apoyarme en todo momento, por compartirme tu comida y por ayudarme a terminar mis mediciones en el HPLC.

Dra. Hilda Calderón, le agradezco su apoyo permanente durante la realización de este proyecto.

Gracias a las Dras. Maricarmen Quirasco y Gloria Díaz por revisar minuciosamente este trabajo y por formar parte de un momento inolvidable de mi vida. Realmente admiro mucho su trabajo.

Gracias a Beka y a Eli por vivir sus últimos momentos como alumnas junto a mí. Sólo ustedes comprenden lo que significó ser alumnas de la temida instrumental I.

Gracias a los conductores del metro que me llevaron y trajeron, a los pasajeros que viajaron a mi lado, a los que me cedieron su asiento y a todas las personas que en algún momento tocaron mi vida de alguna manera poco ortodoxa.

Gracias a mi amada Universidad Nacional Autónoma de México por ser mucho más que una institución de gran nivel educativo, gracias por ser mi hogar durante tantos años, gracias por ser el lugar en el que me terminé de formar como ser humano, el lugar en el que conocí a las personas más grandiosas, y el lugar en el que he sido más feliz. Gracias por educarme en muchos aspectos de mi vida.

INDICE

Resumen	11
Introducción	12

CAPITULO I

Antecedentes

Definición de la bebida destilada denominada tequila	13
Proceso de la producción de tequila	15
Jima de la planta de agave	15
Proceso de hidrólisis de la piña	16
Extracción de azúcares	17
Fermentación de los mostos de agave	17
Destilación de mostos fermentados de agave	19
Proceso de maduración del tequila	20
Compuestos congenéricos en el tequila	21
Características fisicoquímicas y usos de <i>Agave tequilana</i> Weber	
Características físicas de <i>Agave tequilana</i> Weber	23
Composición química de <i>Agave tequilana</i> Weber	24
Usos del agave	26
Levaduras y sus usos	26
Microorganismos de la fermentación natural del tequila	27
Características de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	29
Historia Taxonómica de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	30
Bioquímica, metabolismo y fisiología	31
Aplicaciones biotecnológicas	34
Proceso de la fermentación	37

Efecto Crabtree	41
Tolerancia a etanol	42
CAPITULO II	
Justificación	45
CAPITULO III	
Objetivos Generales	47
Objetivos Particulares	47
CAPITULO IV	
Hipótesis	48
CAPÍTULO V	
Metodología general	49
Hidrólisis del agave	50
Origen de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	50
Preparación del preinóculo de <i>K. marxianus</i> en mostos de agave diluídos	51
Fermentación del mosto 100% agave	51
Fermentación del mosto 51% agave/49% sacarosa añadida	52
Toma de muestras a lo largo de la fermentación	52
Conteo de células viables a lo largo de la fermentación	52
Determinación de azúcares y etanol por cromatografía de gases y líquidos	
Medición de etanol y azúcares por HPLC	53
Preparación de las muestras para HPLC	54

Determinación de etanol, metanol, acetato de etilo y alcohol isoamílico por cromatografía de gases	54
--	----

Preparación de las muestras para cromatografía de gases	55
---	----

Evaluación de la Tolerancia a etanol de <i>K. marxianus</i>	55
---	----

Preparación del medio con etanol	56
----------------------------------	----

CAPITULO VI

Resultados y discusión	58
------------------------	----

Hidrólisis de los tallos de agave en 0.1%v/v de H ₂ SO ₄ y 80°C	58
---	----

Cinética de la fermentación	60
-----------------------------	----

Determinación de azúcares y etanol al final de la fermentación y rendimiento	71
--	----

Determinación de etanol, metanol, acetato de etilo y alcohol isoamílico por cromatografía de gases	79
--	----

Evaluación de la tolerancia a etanol de <i>K. marxianus</i>	82
---	----

CAPÍTULO VII

Conclusiones	84
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	85
---------------------	-----------

ANEXOS

Anexo 1. Curvas patrón empleadas para la determinación de etanol, fructosa, glucosa, inulina y sacarosa vía HPLC	92
--	----

Anexo 2. Curvas patrón utilizadas para la determinación de etanol, metanol, alcohol isoamílico y acetato de etilo por cromatografía de gases	95
--	----

APENDICE 1.

Cálculo de rendimiento teórico para cada fermentación	97
---	----

Cálculo de rendimiento producto/sustrato Y_p/s	98
Cálculo de rendimiento producto/biomasa Y_p/x	99
Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato Y_x/s	100
APENDICE 2.	
Conversión de los datos reportados en la NOM-006-SCFI-2005	100
APENDICE 3.	
Promedio y desviación estándar de fermentaciones	101
Promedio y desviación estándar de destilados	104
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Jimador cortando las pencas de agave	15
Figura 2. Barricas de madera en las que se lleva a cabo la maduración del tequila	20
Figura 3. <i>Agave tequilana</i> Weber	23
Figura 4. Grupos de fructanos presentes en el agave	25
Figura 5. Ruta glucolítica	38
Figura 6. Conversión de piruvato a etanol	40
Figura 7. Gráfico de hidrólisis de inulina	60
Tabla 1. Tabla de condiciones de fermentación	60
Figura 9. Gráfica de cinética de fermentación 20°Bx, 30°C 100% agave	63
Figura 10. Gráfica de cinética de fermentación 20°Bx, 30°C, 51%agave 49% sacarosa	64
Figura 11. Gráfica de cinética de fermentación 10°Bx, 30°C, 51% agave 49% sacarosa	65
Figura 12. Gráfica de cinética de fermentación 10°Bx, 30°C 100% agave	66
Figura 13. Gráfica de cinética de fermentación 10°Bx, 40°C 51% agave 49% sacarosa	67

Figura 14. Gráfica de cinética de fermentación 20°Bx, 40°C 51% agave 49% sacarosa.	68
Figura 15. Gráfica de cinética de fermentación 20°Bx, 40°C 100% agave	69
Figura 16. Gráfica de cinética de fermentación 10°Bx, 40°C 100% agave	70
Figura 17. Gráfica del porcentaje de etanol producido	74
Figura 18. Gráfica de porcentaje de azúcares consumidos en mostos 100% agave	75
Figura 19. Gráfica de porcentaje de azúcares consumidos en mostos 51% agave 49% sacarosa	75
Figura 20. Gráfica de porcentaje de rendimiento de producción de etanol	76
Figura 21. Gráfica de rendimiento producto / sustrato (Y p/s)	77
Figura 22. Gráfica de rendimiento producto / biomasa (Y p/x)	78
Figura 23. Gráfica de rendimiento biomasa / sustrato (Y x/s)	78
Figura 24. Gráfico de congénicos en destilados de las fermentaciones realizadas a 30 °C	81
Figura 25. Gráfico de congénicos en destilados de las fermentaciones realizadas a 40 °C	81
Figura 26. Gráfico de la evaluación de la tolerancia a etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i>	83

RESUMEN

La producción del tequila se basa en la fermentación del mosto obtenido del tallo cocido del agave azul, donde la principal fuente de azúcar fermentable es la fructosa. Este azúcar se obtiene mediante la hidrólisis ácida del polímero a través de la cocción de la piña. El jugo de la piña cocida se extrae en molinos de rodillos y el jugo es recolectado para posteriormente ser usado en la fermentación. Las altas temperaturas alcanzadas durante la cocción provocan la caramelización y en consecuencia la pérdida de azúcares fermentables. La fermentación del mosto se realiza adicionando un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* o dejando fermentar los mostos de manera “natural”. En ambos procesos se ha reportado la presencia de la levadura *Kluyveromyces marxianus*; sin embargo, hasta donde sabemos, no hay reportes sobre la contribución de esta levadura en el proceso de fermentación.

En este proyecto se determinó el tiempo óptimo de la hidrólisis del tallo de agave, así como la cinética de consumo de fructosa y producción de biomasa de *K. marxianus* en mostos. Además, se evaluó la producción de etanol bajo diferentes condiciones de temperatura y concentración de azúcares fermentables (fructosa y sacarosa). Por otra parte, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de etanol sobre la sobrevivencia de *K. marxianus* con el fin de establecer los niveles máximos de tolerancia al etanol.

INTRODUCCIÓN

El tequila es una bebida destilada derivada de la fermentación del mosto obtenido del tallo cocido del agave azul, donde la principal fuente de azúcar fermentable es la fructosa, la cual proviene de la hidrólisis de los polifruktanos provenientes del agave; esta fermentación es llevada a cabo generalmente por *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, se ha reportado la presencia de *Kluyveromyces marxianus* entre otras levaduras, que probablemente contribuyen a la producción de etanol, así como de otros compuestos relacionados con las características organolépticas del tequila. En este trabajo se llevó a cabo una fermentación alcohólica a partir de mostos de *Agave tequilana Weber* de manera similar a la que se llevaría a cabo en la industria tequilera usando como variables el inóculo de *Kluyveromyces marxianus*, la temperatura de la fermentación y la concentración de azúcares en el mosto. Una vez terminada la fermentación, se determinaron los azúcares que se consumieron así como el etanol, metanol, acetato de etilo y alcohol isoamílico que se produjeron bajo las diferentes condiciones de fermentación. Se determinó la tolerancia a etanol por parte de *Kluyveromyces marxianus* en un medio YPD al cual se le adicionaron diferentes concentraciones de etanol. Esto nos ayudó a determinar si *K. marxianus* podía sobrevivir en las condiciones de producción de etanol industriales (Lachance, M. 1995).

1. ANTECEDENTES

Definición de la bebida destilada denominada tequila.

La norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2005 define al tequila como una bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un producto autorizado, la cual debe estar ubicada en el territorio de Tequila, Jalisco, derivados de las cabezas del *Agave tequilana* Weber var. *Azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa.

El tequila es un producto que se obtiene del destilado de mostos de agave, que debe ser ajustado en su concentración de etanol (aprox. 70°), hasta llegar a un contenido alcohólico comercial del (38°-55°). Este tequila entonces puede ser clasificado por:

-La edad o maduración después de la destilación en:

Blanco: Es el producto al que se le ha ajustado el contenido alcohólico para uso comercial, sin ningún proceso de añejamiento.

Tequila joven: Es el producto de la mezcla de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejo, que es susceptible al proceso de abocado.

Tequila reposado: Es un producto susceptible a ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses en contacto con la madera de recipientes de roble o encino.

Tequila añejo: Es un producto susceptible a ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros.

Tequila extra añejo: Producto susceptible a ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años, sin especificar el tiempo de maduración en la etiqueta, en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros.

Por su categoría, la cual se refiere al porcentaje de los azúcares provenientes del Agave que se utilice para la elaboración del tequila en:

- a) “100 % Agave”: Es aquel tequila que no es susceptible a ser enriquecido con azúcares distintos a los obtenidos del *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual además, deberá ser envasado en la planta que controle el propio productor autorizado.
- b) “Tequila”: Es aquel Tequila elaborado a partir de mostos, los cuales son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no

mayor al 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa y el 51% restante será de azúcares reductores provenientes del *A. tequilana* Weber var. Azul (NOM-006-SCFI-1994).

Proceso de producción de tequila

Jima de la planta de Agave

Se le llama jima al proceso en el cual se obtiene la “piña” o “corazón de agave”, este proceso comienza con la selección de agaves maduros que posteriormente son cortados de sus tallos y sus hojas para así obtener la “piña” o “cabeza” de la planta. En la jima se utiliza la herramienta llamada coa, que consiste en una barreta con la punta semicircular sumamente filosa, para cortar y eliminar las hojas del agave quedando sólo la médula, la cual es separada de la tierra eliminando la raíz para dejar la piña.

La jima se realiza con menor frecuencia en la época de lluvias, pues el agua absorbida por la planta provoca una reducción en el contenido de azúcares de las piñas. Para poder llevar a cabo este paso generalmente se emplean piñas de 90 kg en promedio y de madurez de entre 6 y 10 años de edad (García, 1998).



Figura 1. Jimador cortando las pencas del agave.

Proceso de hidrólisis de la piña

La piña o corazón del agave, tiene como carbohidrato de reserva inulina el cual no es fermentable, por lo que para obtener fructosa (azúcar fermentable), se debe llevar a cabo la hidrólisis de la piña del agave.

Una de las formas de obtener fructosa es por la hidrólisis ácida de la inulina, puesto que la inulina se puede hidrolizar a valores de pH de 1 a 2, y a temperaturas de entre 80 y 100 °C durante 1 o 2 horas.

En la elaboración del tequila de manera tradicional, las piñas de agave son cocidas con vapor, en hornos de piedra durante 36 horas para poder hidrolizar los fructanos; sin embargo, recientemente algunas destilerías han cambiado los hornos por autoclaves para así reducir el tiempo de cocción del agave. En la fábrica, las piñas se someten a un proceso de cocción que se puede llevar a cabo en hornos de adobe por 48 horas, en hornos de mampostería por 24 horas o en autoclaves metálicas por 6 horas. El objetivo principal del cocimiento es realizar la hidrólisis de la inulina para obtener la mayor cantidad posible de azúcares fermentables. Por las condiciones de este proceso, también se presentan otras reacciones como la caramelización de azúcares, que dependiendo del grado que alcance la reacción, pueden tener efectos deseables o indeseables en el producto final. Uno de los compuestos que se producen en este paso es el hidroximetil furfural (HMF) compuesto que se genera por reacciones de Maillard y que además juega un papel importante en el sabor del tequila, ya que los furanos y los piranos imparten una nota dulce, el benzaldehído da notas florales y el fenilacetaldehído proporciona aroma floral.

Durante la cocción, parte del vapor se condensa y se acumula en el horno o autoclave, el vapor que se condensa empieza entonces a extraer azúcares y otros compuestos del agave por difusión generando una miel que es colectada en este paso. Además los productos de oxidación y de deshidratación de los azúcares son generados también en este paso. A lo largo de la hidrólisis la proporción de fructanos decrece y la proporción de fructosa aumenta de un 12% a un 80% y la glucosa aumenta de un 2% a un 8%. Después de esto se extrae el jugo del agave y se mezclan ambos jugos para ser fermentados (Ricca. E, *et al.*, 2007; Hofmann, *et al.*, 2000; Waleckx *et al.*, 2008; Sánchez-Marroquin y P.H. Hope, 1953).

Extracción de azúcares (Molienda del agave)

Primero, el agave ya cocido entra en una máquina desgarradora para ser desfibrado y posteriormente pasa por prensas en donde las fibras se exprimen y se obtienen los jugos del agave; para lograr una buena extracción se puede adicionar agua. El jugo obtenido se ajusta normalmente a 14° Bx con el fin de obtener una buena fermentación, lo que da origen al mosto que será sometido a fermentación. Si el Tequila no está destinado a ser 100% agave, en esta etapa, es cuando se adiciona al mosto azúcares de otro origen.

Fermentación de los mostos de agave

La fermentación dura entre uno y seis días dependiendo de condiciones como: cepas de levaduras seleccionadas, desarrollo de un inóculo previo y la temperatura entre otros.

Cuando la fermentación se lleva a cabo con un cultivo iniciador se suele utilizar levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, esta cepa es mantenida por liofilización o congelación en nitrógeno líquido. La propagación del cultivo iniciador se lleva a cabo en condiciones asépticas, utilizando un medio formulado con mosto enriquecido para promover el crecimiento celular. Cuando se alcanza un crecimiento de 10^8 células por mililitro se inoculan los tanques donde se llevará a cabo la fermentación con un 5 o 10% (v/v) de un cultivo previo de la levadura para tener un cultivo iniciador con 10^6 células/mL. Este proceso fermentativo puede durar entre 20 y 32 horas, dependiendo de la concentración inicial de azúcar en el mosto y de la cantidad de alcohol deseado, que puede ser de 6% para tequila y de 4.5% para tequila 100%. Si no se adiciona inóculo la fermentación podría durar hasta 7 días.

Esta es una etapa que no es muy controlada puesto que varía de empresa a empresa, ya que principalmente no se cuenta con una cepa o un cultivo estándar para utilizar como inóculo, y se ha demostrado que la levadura influye de manera importante en los compuestos que se obtienen en el producto final, principalmente se ha observado la influencia sobre alcoholes superiores. La variedad de inóculos que se utilizan es amplia, incluye desde cepas aisladas y controladas, levadura de panificación, e incluso hay empresas que prefieren una fermentación más compleja en términos de diversidad microbiana por lo que permiten que se lleve la fermentación de manera natural; si éste es el caso, el mosto no se esteriliza.

En fermentaciones vinícolas se sabe que una de las limitantes en la síntesis de proteínas es la disponibilidad de nitrógeno en el medio, lo cual produce

problemas durante la fermentación, por lo que para esta etapa es necesaria la adición de una fuente de nitrógeno en el mosto (Cedeño y Álvarez, 1995; PROY-NOM-006-SCFI-2004; Arrizon y Gschaedler, 2002).

Destilación de mostos fermentados de agave

Tiene como objetivo separar el contenido alcohólico y otros componentes responsables del olor y sabor, de las levaduras, azúcares no fermentables, minerales, etc. Se realiza en dos etapas: la primera, conocida como “destrozamiento” o “desflemación” que consiste en separar todo el etanol y otros compuestos del resto de sustancias que componen el mosto muerto. Se obtiene un producto llamado “ordinario” que contiene entre 20 y 30 % (v/v) de etanol. Esta etapa se realiza en tiempos cortos de 1 a 2 horas en alambiques; pocas empresas lo hacen en una columna desflemadora. La segunda etapa, llamada “rectificación”, se realiza en alambiques destinados solo para esta etapa, aquí el “ordinario” se destila preferentemente en forma lenta, en 4 o más horas, con el fin de obtener alcohol y otros compuestos, se obtiene con una concentración final de alcohol que oscila entre 55 y 76% (v/v). Posterior a la destilación se relacionan las operaciones que dependen del tipo de Tequila que se desee obtener, por ejemplo: si el Tequila es blanco, se hace un ajuste con agua de la graduación alcohólica final para proceder a embotellarlo; pero si se someterá a un proceso de reposo o añejamiento antes de pasarlo a barricas, el contenido alcohólico se ajusta a 55 % (v/v) pues ya es considerado tequila y es como se comercializa a granel. Antes de envasarse, este destilado se diluye con agua potable, destilada o desionizada hasta lograr productos finales de 38% a 43% (v/v) de etanol.

Proceso de maduración del tequila

Una vez destilado, el producto final se almacena en tinajas de paso donde se diluye para ser transferido a las barricas donde se añejará, éstas barricas son de roble o encino blanco, maderas que confieren al producto final aromas, colores y sabores que dependerán de factores como la edad, grosor de la duela, graduación alcohólica y condiciones de reposo y añejamiento.

Por último, antes de embotellar se eliminan algunos sólidos de la madera mediante la filtración con celulosa o carbón activado (NOM-006-SCFI-1994; Noriega. A, 2007).



Figura 2. Barricas de madera en las cuales se lleva a cabo la maduración del tequila.

Compuestos congenéricos en el tequila.

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras producen principalmente etanol y CO₂ además compuestos de sabor como productos secundarios.

El sabor y el aroma de las bebidas alcohólicas están influenciados principalmente por el etanol que es el compuesto mayoritario en la bebida; sin embargo, una gran variedad de compuestos orgánicos presentes en cantidades menores es también responsable de estos atributos y contribuyen de gran manera a las características distintivas del tequila; estos compuestos que se encuentran en menor concentración son los llamados congenéricos.

El origen de los congenéricos se encuentra principalmente en la cepa de la levadura y otros microorganismos presentes en la fermentación, la temperatura de la fermentación, la concentración de oxígeno en el medio, la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, el tipo y la concentración de azúcares fermentables, la concentración y tipo de aminoácidos y la concentración de algunas vitaminas.

La formación de estos compuestos generalmente es deseable; sin embargo, existen algunos compuestos que no se desean por lo que se deben tener en concentraciones muy bajas, por ejemplo el metanol que es un alcohol de alta toxicidad.

En el primer estudio del que se tiene referencia realizado en el tequila*; se reportaron compuestos como el acetaldehído, el formiato de etilo, el acetal, el metanol, el etanol y tres alcoholes superiores. En estudios posteriores se

reportó que en el tequila se encuentra en mayor proporción el acetato de etilo y alcoholes superiores de bajo peso molecular.

Benn y Peppard (1996) distinguieron más de 175 compuestos volátiles en tres tipos de tequila; alta concentración de alcoholes superiores con bajas concentraciones de ésteres, acetales, terpenos, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, fenoles y sulfuros.

En el tequila y en el mezcal se han caracterizado más de 18 compuestos distintos y se estima que puede haber más de 200. La mayor parte de los congénicos se encuentran en concentraciones muy bajas; sin embargo, éstos contribuyen a la complejidad y el aroma de las bebidas a pesar de que su concentración está por debajo del umbral de la percepción del gusto.

Estos compuestos son producidos por el metabolismo de las levaduras y cada especie, e incluso cada cepa afecta de manera distinta al producto final ya sea a través de la producción de estos compuestos, o de manera indirecta ejerciendo presión sobre la población de las levaduras que los producen. En fermentaciones de vinos es aceptado que las levaduras que no son *Saccharomyces* contribuyan a mejorar el perfil aromático secundario de los vinos así como el sabor, mientras que las *Saccharomyces cerevisiae* y la materia prima contribuyen al sabor y aroma principal (*Esteve- Zarzoso *et al.*, 1993, Incitti, *et al.*, 1980, Santillán, 1998, Manjarrez. A y M. Llama, 1969, Patel y Shibamoto, 2003).

Características fisicoquímicas y usos de *Agave tequilana* Weber.

Características físicas de *Agave tequilana* Weber.

Una de las principales características para la producción del tequila es que sea el producto de una fermentación de mostos de agave y después ser destilada. La especie *Agave tequilana* Weber tiene una gran importancia, ya que ésta es la planta que se utiliza en la producción de esta bebida.

El botánico alemán Franz Weber, en 1902, inscribe en la taxonomía de las plantas señalando las siguientes propiedades: intenso color azul de la roseta, hojas azul verdosas, delgadas y semejantes a grandes espinas que se extienden de forma radial y llegan a medir hasta tres metros. Esta planta requiere, para su crecimiento, una altitud de 1500 metros sobre el nivel del mar; suelo de origen volcánico, arcilloso, abundante en basalto y hierro; lluvia de un metro anual; temperatura promedio de 20°C; para su cultivo las plantas deberán tener una separación de un metro entre ellas.

La edad adecuada para la reproducción es de entre tres y cinco años y una planta madre da entre uno o dos hijos al año. Un agave requiere de ocho a diez años para obtener su madurez (Ortiz. F., 2003).



Figura 3. *Agave tequilana* Weber

Composición química del *Agave tequilana* Weber.

La composición química del “corazón” y de la base de la hoja del agave es de 69 a 68.5% de humedad, 22.3 a 22.7% de carbohidratos totales, proteínas de 1.3 a 1.4%, minerales de un 1.7 a 1.9% y de 5.9 a 7.1% de fibra soluble. Los componentes de los carbohidratos del corazón y la base de la hoja del agave son en su mayoría polifruktanos y un pequeño porcentaje de sacarosa (0.5-1.3%). Los polifruktanos son polímeros compuestos principalmente de unidades de fructosa unidas a una unidad de sacarosa; estos compuestos en las especies de *Agave* son sintetizados y almacenados en los tallos y funcionan en la planta como carbohidrato de reserva y como osmoprotector en la sequía.

De acuerdo a estudios recientes los fructanos de *A. tequilana* Weber var. Azul consisten en una mezcla compleja, principalmente fructanos altamente ramificados y neo-fructanos con enlaces del tipo β -(2-1) y β -(2-6) entre las unidades de fructosa (figura 5); también reportan que en un análisis realizado por HPLC el 93.4% de los carbohidratos son fructanos de mayor o igual a 3DP (grado de polimerización), el 2% son disacáridos libres, el 0.8% es glucosa libre y el 3.8% es fructosa libre (Wang *et al.*, 1998; Praznikl, *et al.*, 2002; Waleckx *et al.*, 2008; Guzmán. J, 2006).

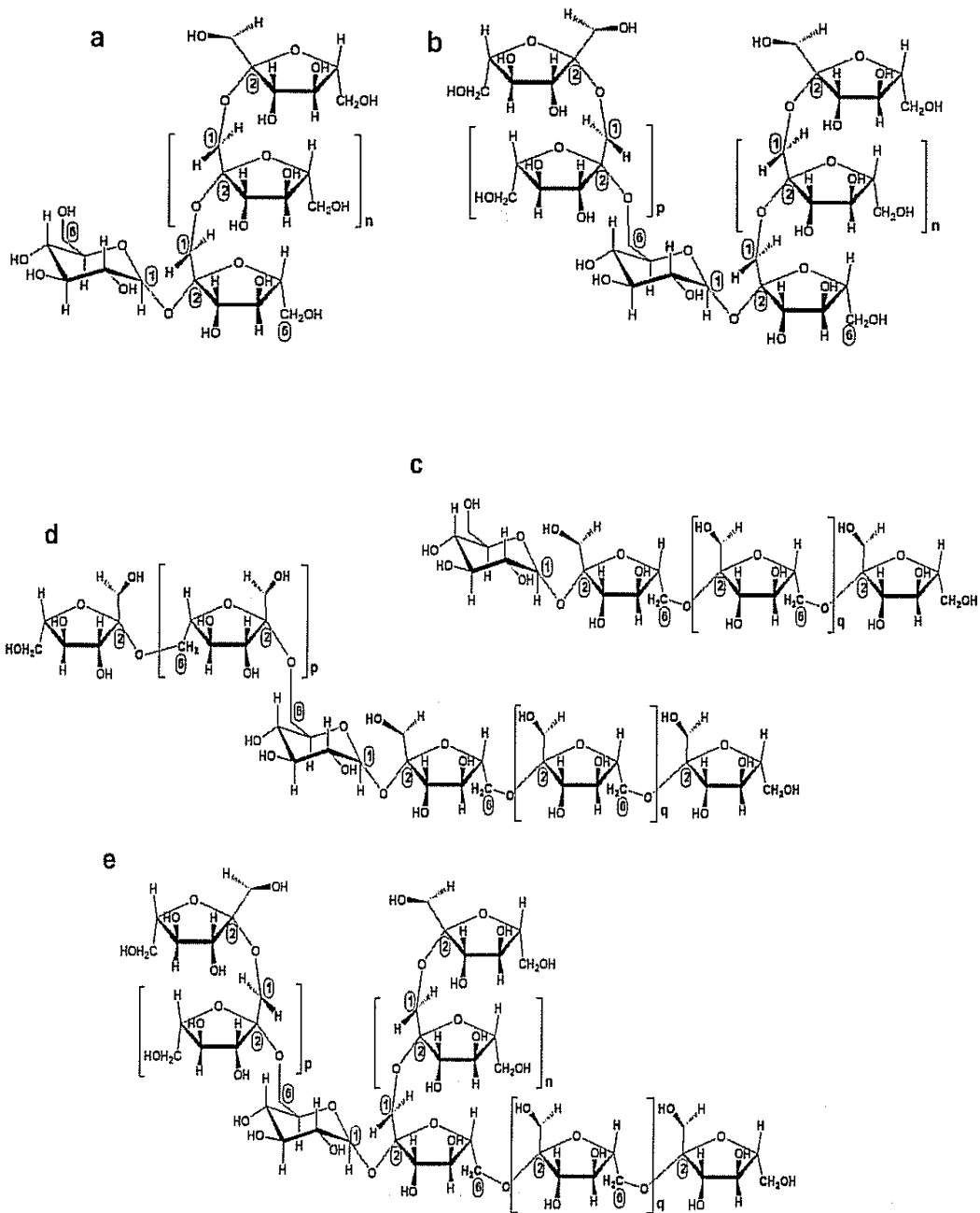


Figura 4. Grupos de fructanos (a) las inulinas están compuestas por una cadena con enlace lineal β -(2-1)-fructosilo unida al residuo fructosilo de la sacarosa inicial.(b) Las neoserias de inulina están compuestas de dos cadenas lineales tipo β -(2-1)- fructosilo, una unida al residuo fructosilo de la sacarosa y la otra unida al residuo glucosilo.(c) Los levanos están compuestos de una cadena fructosilo unida por un enlace lineal β -(2-6) unido al residuo fructosilo de la sacarosa. (d) Las neoserias de levanos están compuestas de dos cadenas lineales β -(2-6)-fructosilo, una unida al fructosilo residual de la sacarosa y la otra unida al residuo glucosilo. (e) La mezcla de fructanos presenta los dos grupos de enlaces, β -(2-1) y β -(2-6) entre las fructosas. Los fructanos de este grupo pueden ser ramificados si los dos tipos de enlace están presentes en la misma molécula de fructosa y pueden contener la típica glucosa interna de las neoserias (Waleckx *et al.*, 2008).

Usos del Agave

El agave o maguey es una planta típica de México que durante el florecimiento de las culturas mesoamericanas desempeñó un papel importante ya que sirvió para el hombre como alimento, fuente de calor, techo, vestido, medicina, bebida, uso religioso, ornato, muebles, implementos agrícolas, forrajes y otros usos diversos, como por ejemplo la utilización de las fibras del agave para uso textil, el uso de las flores de la planta como alimento y los tallos florales que llegan a medir más de tres metros se usan en la construcción o como cercas de corrales para delimitar terrenos (García, 1998).

Levaduras y sus usos.

Las levaduras son hongos unicelulares situados en la escala evolutiva entre las bacterias y las células superiores, que existen en ocasiones como arreglos de células y viven por lo general en ambientes fluidos. Poseen algunas de las características de los hongos superiores como un gran tamaño celular entre 10 y 100 micras, la misma organización celular, una composición química de la pared a base de quitina, hemicelulosa o celulosa y un metabolismo quimioorganotrófico, sin embargo su reproducción es casi siempre asexual. Las levaduras son organismos que pueden cambiar su metabolismo de oxidativo a fermentativo por lo que se les incluye en el grupo de los aerobios facultativos. Las levaduras se reproducen asexualmente por bipartición o por gemación. En la reproducción sexual las levaduras se unen a

otras levaduras y como resultado forman ascosporas. En algunas levaduras la gema o brote formado queda adherido a la célula madre, los brotes sucesivos dan lugar a la formación de un talo de transición denominado pseudimicelio.

En la actualidad las levaduras, además de ser usadas en la producción, enriquecimiento y preservación de alimentos, se usan por ejemplo en la producción a gran escala de etanol, de vitaminas del complejo B, y tiamina, en la producción de algunas proteínas y hormonas esteroideas principalmente para uso médico; están presentes en la producción de antibióticos, de algunos colorantes como la astaxantina que sirve para dar la coloración rosada a los salmones criados en cautiverio, la producción para algunas enzimas de la panificación, así como la producción de biomasa para alimentar animales. Además tienen aplicaciones agroindustriales y en la industria de las biotransformaciones (King y Dickinson, 2000; Collado, 2001; Ramírez-Gama; *et al*, 1996; Astromoff, 2000).

Microorganismos de la fermentación natural del tequila

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sido las más empleadas en las fermentaciones alcohólicas, pero no es el único microorganismo que participa en dicho proceso bioquímico, sino la conjunción de varios microorganismos que no sólo generan etanol, sino que también generan muchos otros compuestos característicos de las bebidas alcohólicas.

En una planta productora de tequila donde se lleva a cabo la fermentación de manera natural, Lachance (1995), reportó la presencia de diferentes especies de levadura durante la fermentación. En las piñas de agave encontró *Clavispora lusitaniae*, *Metschinkowia agaveae*, y *Kluyveromyces marxianus*; en las moscas de fruta que volaban cerca del área de proceso encontró *Pichia kluyveri*, y *Hanseniaspora guilliermondii*. En las melazas de agave *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces marxianus*. En el equipo de molienda y desgarramiento de las “piñas”, *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*. También aisló e identificó diferentes levaduras durante la fermentación. En las etapas iniciales de la fermentación aisló e identificó *Torulaspora delbrueckii*, especies de *Hanseniaspora*, especies de *Bretanomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*. Conforme la fermentación progresaba, la diversidad microbiana se iba reduciendo hasta quedar como dominante la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Lachance (1995) encontró además de estas levaduras una concentración relativamente alta de bacterias productoras de ácido siendo las predominantes *Leuconostoc spp.* y *Lactobacillus spp.* Además, reporta un total de 10 especies de levaduras durante la fermentación; sin embargo, no hay datos suficientes en cuanto a la diversidad de las poblaciones de levaduras en función del tiempo ni de la contribución de cada una de ellas durante el proceso.

Por otro lado, debido a que no existen estudios sobre el motivo de la persistencia de algunas levaduras durante la fermentación de tequila, en la fermentación vinícola, se ha propuesto que cuando la concentración de

azúcar en el mosto incrementa del 12 al 18%, ocurre una disminución en el crecimiento de las levaduras. Así mismo, la desaparición progresiva de las levaduras se atribuye al aumento de la concentración de etanol en el medio, la temperatura de la fermentación y disponibilidad de nutrientes (Noriega. A, 2007; Lachance, 1995).

Características de *Kluyveromyces marxianus*.

Kluyveromyces marxianus, pertenece a la división Ascomicetos de la clase Hemiascomicetos del orden de los Sacaromicetales y pertenece a la familia de las Sacaromicetaceas. Es una levadura que en medios sólidos (YM) forma colonias blanca crema en forma de oval, ésta tiene una reproducción vegetativa por yemas con aparentes ascas que contienen más de 4 ascosporas con forma de riñón.

Tiene la capacidad de fermentar D-glucosa, sacarosa y de manera variable D- galactosa, maltosa, α,α -trehalosa, lactosa, celobiosa, rafinosa e inulina; además puede crecer en D- glucosa, D- galactosa, sacarosa, rafinosa, D-L- lactato, etilamina, L-lisina, cadaverina, a 0.01 y 0.1% de ciclohexamida y crecer de manera variable en L- sorbosa, D-ribosa, D-xilosa, L-arabinosa, maltosa, α,α -trehalosa, Me α -D-glucosido , celobiosa, salicina, arbutina, lactosa, melezitosa, inulina, almidón, glicerol, ribitol, xlitol, D- glucitol, D- manitol, succinato, citrato, etanol, 1,2 propanodiol, 2,3 butanodiol, D- triptofano, en 50% de D-Glucosa, 10% de NaCl y de 40 a 45° C (Barnet *et al.*, 1990).

Historia taxonómica de las especies *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus fue descrita primeramente, en 1888, por E.C. Hansen, que en ese entonces la nombró *Saccharomyces marxianus*. Después Marx, la persona que originalmente aisló esta levadura de las uvas, en su monografía describe 10 cepas de *S. marxianus*, junto con una cepa particular etiquetada como *Zygosaccharomyces marxianus* la cual fue depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en 1922 por H. Schnegg y actualmente esa cepa es la denominada CBS 712. Para ese entonces, ya se habían encontrado y apuntado algunas diferencias entre estas cepas, como la formación de pseudomicelios, y la capacidad de asimilar y fermentar lactosa así como algunos hábitats en donde *S. marxianus* había sido aislada. Ya para 1939 Sacchetti había observado que *S. marxianus* fermentaba inulina además de que ya se había visto la diferencia entre *S. marxianus* y *Saccharomyces fragilis* y, en 1951 Luh y Phaff afirmaron que esta última era la única cepa capaz de usar pectina.

Principalmente debido a las diferencias entre las esporas y la morfología de las ascas, en la capacidad de fermentar y oxidar diferentes azúcares y en el suceso de hibridación entre cepas, fue necesario reclasificar las especies *S. fragilis* y *S. marxianus* además de *S. lactis* en una nueva taxonomía. En 1956, van der Walt describió el nuevo género *Kluyveromyces*, el tipo de especie en el cual estaba *Kluyveromyces polysporus*. Después se encontró que esta última levadura tenía propiedades muy similares a las de las tres especies mencionadas previamente, y consecuentemente fueron reclasificadas dentro del género de *Kluyveromyces*, el cual está conformado por 18 especies en la

segunda edición de *The yeast, a taxonomic study*. Nuevamente, *Kluyveromyces fragilis* fue considerada muy similar pero aún distinta de *Kluyveromyces marxianus* y esto debido a su alta capacidad de fermentar lactosa.

En la tercera edición de ese libro, el género *Kluyveromyces* fue dividido en 11 especies y la taxonomía de *Kluyveromyces marxianus* fue organizada en siete variedades. En la más reciente edición de este libro, el género de *Kluyveromyces* incluye 15 especies y las siete variedades descritas dentro de este género, fueron eliminadas por ser consideradas como especies ya sea independientes o sinónimos de *K. lactis* o *K. marxianus*. Esto es debido al análisis de la estructura genética de las poblaciones, en combinación con su habilidad de hibridar como criterio de clasificación. Consecuentemente, las primeras especies o variedades *Kluyveromyces bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. fragilis*, y *K. wikenii* no pueden ser consideradas distintas de *K. marxianus* (Fonseca, *et al.*, 2008).

Bioquímica, metabolismo y fisiología de *Kluyveromyces marxianus*.

La mayor parte de los estudios publicados sobre *K. marxianus* han explorado sus aplicaciones sin investigar lo que ocurre a nivel intracelular por lo que usualmente es sembrada en un medio específico y se suele cuantificar el sustrato, los productos y la concentración celular. En lo que concierne a la fisiología los balances de carbono se han visto poco, lo que significa que es posible tener una imagen aproximada de las reacciones celulares y por lo tanto de la fisiología del organismo.

En la actualidad algunos de los estudios están enfocados a los métodos de identificación y clasificación de *K. marxianus*, éstos incluyen la observación de que en contraste con *Saccharomyces cerevisiae*, el ergosterol es el único esteroide presente en *Kluyveromyces marxianus*, el uso de microcalorimetría para propósitos de identificación, la caracterización de coenzima Q y los patrones monosacáridos de la pared celular.

En otros casos, *K. marxianus* ha sido empleada simplemente como fuente de algunos compuestos en específico (principalmente enzimas). Ejemplos de este tipo de estudios incluyen aquellos en fructosa-1,6-bisfosfatasa, uridina bifosfato glucosa-4-epimerasa, fosfatasa ácida, amina oxidasa, proteínas fosfatasas, carboxipeptidasas y aminopeptidasas. Se han llevado a cabo estudios sobre el transporte de azúcares y de ácidos orgánicos. Se han llevado a cabo estudios metabólicos en *K. marxianus*, tal como el papel del complejo I en la cadena respiratoria, la regulación de adenilato ciclasa, la caracterización funcional de Mig 1p, el análisis de la composición de la pared celular, su rol en la resistencia a fármacos, y la regulación de nicotinamida adenindinucleótido fosfatasa (NADP⁺)-dependiente de glutamato deshidrogenasa. Muchos de los estudios referidos anteriormente, fueron llevados a cabo anteriormente en *Saccharomyces cerevisiae*.

En términos de estudios bioquímicos sobre enzimas de interés industrial, *K. marxianus* ha sido empleada como fuente de inulinasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, y endopoligalacturonasa. Además de éstas, en general algunas con potencial para su aplicación industrial tal como las proteínas fosfatasas, carboxipeptidasas, y aminopeptidasas.

En los años 70, los estudios se enfocaron en la influencia de factores ambientales sobre el crecimiento de *K. marxianus*; para 1973 Chassang-Douillet *et al.*, presentaron la primera comparación fisiológica entre *K. marxianus* y *S. cerevisiae* la cual se llevó a cabo en un medio sintético en el que demostraron que el llamado efecto glucosa o de Crabtree estaba ausente en *K. marxianus*. Estudios posteriores por parte de Sánchez y Castillo en 1980 reportaron los efectos del pH, concentración de etanol y concentración de azúcar en la cinética de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus*. De manera importante *K. marxianus* empezaba a ser incluida en estudios bioquímicos y fisiológicos comparativos con otras levaduras tales como la represión catabólica publicado en 1984 por Eraso y Gancedo, sensibilidad hacia algunas toxinas en 1984 por Sukroongeung *et al.*, e inhibición de crecimiento por ácidos grasos en 1989 por Viegas y sus colaboradores.

En los años 90, se empezó a trabajar en medios sintéticos para estudios cuantitativos con trabajos enfocados en la regulación de la respiración, la fermentación y el llamado efecto Crabtree en las levaduras. Después fue demostrado cuantitativamente el carácter Crabtree-negativo en *K. marxianus* después de haber observado que no produce etanol después de aplicar un pulso de glucosa a las células respirando, en contraste con lo comúnmente observado en *Saccharomyces cerevisiae* y aún con *K. lactis*. Esto se confirmó posteriormente en el 2004, pero Castrillo y Ugalde (1993) mostraron que cuando el metabolismo oxidoreductor de *K. marxianus* se coloca en función de incrementar el flujo glicolítico, la máxima capacidad respiratoria de las células no se ha conseguido, mientras que *S. cerevisiae*, en el comienzo del metabolismo respirofermentativo, coincide con el alcance de su máxima

capacidad respiratoria. De estos estudios, *K. marxianus* fue clasificada como fermentativa facultativa y Crabtree-negativa. Es importante notar que esta levadura no puede crecer bajo condiciones de anaerobiosis estricta y que el suceso de la producción de etanol está casi exclusivamente ligado a la limitación de oxígeno. Más recientemente, Blank *et al.*, (2005) mostró que *Kluyveromyces marxianus* presenta el flujo más alto del ciclo del ácido tricarboxílico de 14 levaduras estudiadas mientras es cultivada en lote en un medio con glucosa.

Otros estudios fisiológicos hacen reportes en temas como la floculación, la influencia del CO₂ en la sobrevivencia de *K. marxianus*, los efectos en el rendimiento de la biomasa al incrementar la presión del aire, la respuesta de *K. marxianus* a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, y la composición macromolecular de las células de *K. marxianus* en función de la velocidad específica de crecimiento (Fonseca *et al.*, 2008; Bajpai y Margaritis, 1982).

Aplicaciones Biotecnológicas de *Kluyveromyces marxianus*.

Al evaluar a *Kluyveromyces marxianus* para aplicaciones biotecnológicas es imposible no considerar a especies más populares como *S. cerevisiae* y *K. lactis*. La primera es posiblemente la más empleada en biocatálisis y como organismo modelo en estudios biológicos, y la última ha sido elegida como un modelo de Crabtree-negativa y como consumidora de lactosa. El hecho de que *K. marxianus* haya obtenido la denominación GRAS (generalmente reconocida como segura) de la misma manera que las levaduras

anteriormente mencionadas, indica que en ese aspecto no se ve en desventaja con respecto a esas levaduras.

El avance en las aplicaciones biotecnológicas de *Kluyveromyces marxianus* ha dado una gran ventaja cuando se compara con *K. lactis*, pues tiene la capacidad de usar un vasto número de sustratos, puede crecer a temperaturas superiores y su velocidad específica de crecimiento es más alta, además ha sido aislada de una gran variedad de hábitats; por lo que estas características la hacen tener un amplio potencial biotecnológico y algunas de esas aplicaciones se muestran a continuación.

Si bien algunas levaduras han sido empleadas para la producción de compuestos de aroma, sólo unas cuantas tienen aplicación industrial debido a la denominación GRAS. *Kluyveromyces sp.* produce compuestos de aroma como ésteres frutales, ácidos carboxílicos, cetonas, furanos, alcoholes, alcoholes monoterpénicos y acetato isoamílico en fermentaciones líquidas, además de producir 2-fenil etanol que es muy importante a nivel comercial pues este alcohol proporciona características sensoriales que influyen en la calidad del vino, las bebidas destiladas o alimentos fermentados. *Kluyveromyces marxianus* posee la habilidad natural de excretar enzimas lo cual es deseable pues disminuye el costo de éstas. Una de las enzimas secretadas por *K. marxianus* es la enzima pectinolítica la cual es producida únicamente en la fase exponencial del crecimiento; además se ha reportado que tiene actividad pectolítica cuando crece sin agitación y en condiciones aeróbicas.

Algunos autores han demostrado que *K. marxianus* es muy versátil y que puede ser explotada en un amplio rango de aplicaciones, por ejemplo: la producción de enzimas como inulinasa, lactasa, pectinasa, y lipasa.

Otra de las cualidades importantes de *K. marxianus*, es que tiene la capacidad de producir etanol a temperaturas elevadas, lo que la hace interesante en el aspecto de los costos de producción del mismo ya que pudiera evaporarse el etanol continuamente del medio bajo presiones reducidas; sin embargo, la tolerancia al etanol por parte de *K. marxianus* es menor con respecto a *S. cerevisiae*, y esto tiene correlación con la actividad ATPasa de la membrana plasmática. Hacking *et al.*, (1984) investigaron la habilidad de algunas cepas para fermentar glucosa a etanol a altas temperaturas, y la tolerancia de todas las especies pareció decrecer con la temperatura, pero en general, las cepas de *Kluyveromyces* fueron más termotolerantes que *Saccharomyces*, quien en cambio puede tener rendimientos más elevados en la producción de etanol.

Kluyveromyces marxianus CECT 10875 es capaz de fermentar glucosa a etanol a temperaturas de alrededor de 40 °C por lo que ésta es considerada una levadura termorresistente.

Kluyveromyces marxianus MTCC1288 fue empleada para fermentar suero de queso y así obtener etanol empleando su actividad β -galactosidasa.

Otra de las cualidades de *Kluyveromyces marxianus*, es que tiene la capacidad de producir compuestos de aroma tales como 2-feniletanol y 2-feniletacetato mediante vías catabólicas y anabólicas. Además de estas características, ésta cepa posee actividad inulinasa.

Otra aplicación potencial de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, es su uso en panificación y como agente anticolesterolémico y por último, ésta ha sido investigada como hospedero para la producción de proteínas heterólogas (Fonseca *et al.*, 2008; Rowenhorst, *et al.*, 1990; Zafar, *et al.*, 2006; Sree, *et al.*, 1999; Wittman, *et al.*, 2002).

Proceso de la fermentación

La fermentación es la alternativa bioquímica de los microorganismos para la obtención de energía en condiciones de hipoxia o de ausencia total de oxígeno. La respiración es un proceso de obtención de energía a través de la oxidación-reducción de diferentes compuestos con la diferencia de que en la fermentación el aceptor de electrones no es el oxígeno, sino un intermediario orgánico oxidado. Aunque los combustibles más comunes para la fermentación son los azúcares, especialmente glucosa, la fermentación como tal, puede llevarse a cabo con moléculas de ácidos grasos, aminoácidos o bases nitrogenadas.

Obtención de energía a partir de glucosa

La vía de la glucólisis es una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas que convierten a la glucosa en piruvato (véase figura 5). La conversión de una molécula de glucosa a dos moléculas de piruvato se acompaña de la conversión neta de dos moléculas de ADP en ATP.

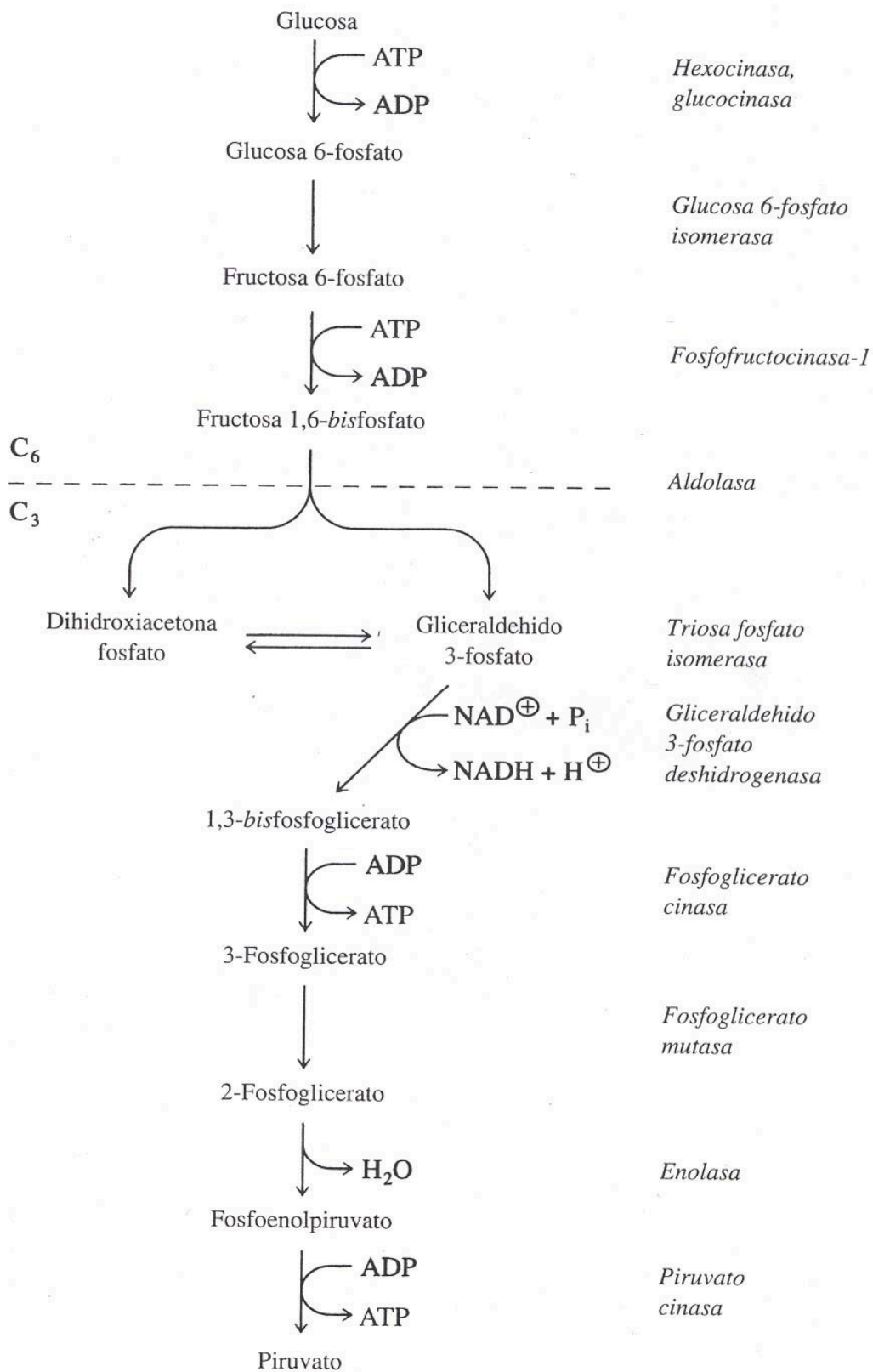


Figura 5.- Ruta glucolítica como evento en la obtención de energía (Voet. D y Voet. J, 2005).

Conversión de piruvato a etanol.

La conversión de glucosa a piruvato se acompaña no sólo por la síntesis de ATP sino también por la reducción de NAD^+ a NADH en la etapa de la gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa. A fin de que la glucólisis pueda operar en forma continua, la célula debe tener una forma de regeneración del NAD^+ . Esta regeneración se obtiene en anaerobiosis sobre todo por el proceso de la fosforilación oxidativa, la cual necesita oxígeno.

Pero en ausencia de oxígeno, las células de levadura convierten el piruvato en etanol y CO_2 , en el proceso que oxida el NADH a NAD^+ . Participan dos reacciones. Primero el piruvato es descarboxilado a acetaldehído en una reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa. En seguida la alcohol deshidrogenasa cataliza la reducción del acetaldehído a etanol transfiriendo los electrones a partir del NADH (véase figura 6).

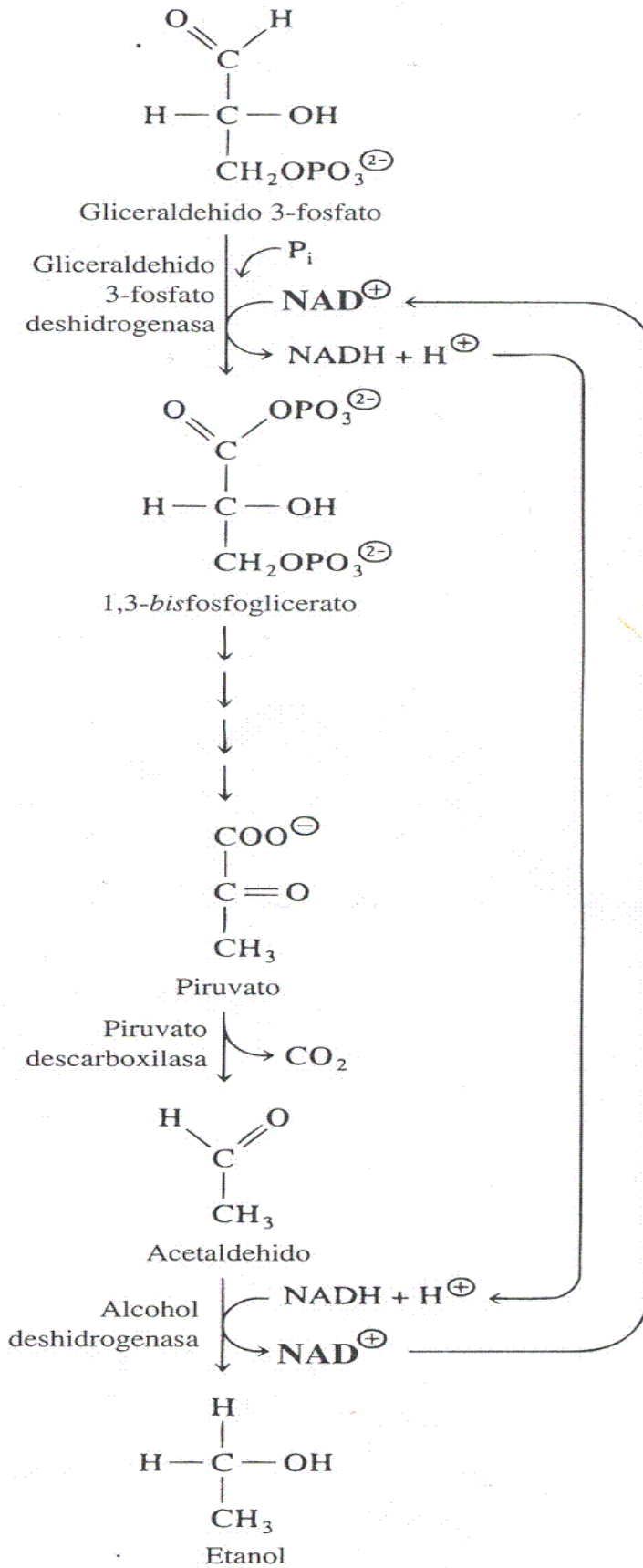


Figura 6.- Conversión de piruvato a etanol (Voet. D y Voet. J, 2005).

Efecto Crabtree

Este fenómeno, está relacionado con la concentración de glucosa en la ruta catabólica adoptada por las levaduras sensibles a la glucosa en presencia de oxígeno, y estados donde aún bajo condiciones aerobias, la fermentación predomina sobre la respiración. De este modo, aunque el oxígeno pudiera estar presente, el NADH generado durante la glucólisis es oxidado principalmente por la fermentación más que por la respiración. A corto plazo, el efecto Crabtree se observa como una repentina respuesta fermentativa después de haber agregado un exceso de azúcar en un cultivo en donde no se lleva a cabo una fermentación, mientras que a largo plazo, se manifiesta como una fermentación aeróbica cuando las levaduras se encuentran completamente adaptadas en un estado estacionario fisiológico. El último ha sido explicado basándose en la capacidad respiratoria limitada de las levaduras Crabtree-positivas y el primero, en la saturación de la respiración conduciendo a una salida de piruvato.

El efecto Crabtree no se presenta en las levaduras que no son sensibles a la glucosa, tal es el caso de *Kluyveromyces marxianus* y *Candida utilis*. Esta última, puede limitar su ciclo glicolítico acumulando carbohidratos intracelulares de reserva o las células pueden mostrar una regulación alterada del consumo de azúcar. En *Saccharomyces cerevisiae* el efecto Crabtree se cree que se debe a que la glucosa reprime la síntesis de enzimas respiratorias y / o inactiva las enzimas respiratorias y la actividad del transporte de azúcar (Walker. G.,1998).

Tolerancia a etanol

Uno de los factores más importantes para poder llevar cabo una fermentación alcohólica, es la resistencia de la levadura a las condiciones del medio durante el proceso, ya que en éste, las levaduras se ven sometidas a cierto estrés. Uno de esos factores de estrés, es la concentración de etanol en el medio puesto que el alcohol, es altamente toxico en el metabolismo de las levaduras. Lo anterior, provoca aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, decremento en la concentración de ATP y la inhibición de ATPasa que posiblemente ocurra al final de la fermentación. El estrés al etanol inhibe el sistema de transporte de aminoácidos y transporte de glucosa y puede conducir a la pérdida de viabilidad celular y la inhibición del crecimiento celular. Las tasas de producción de etanol se reducen con la acumulación de etanol en el medio de cultivo, sobre todo cuando se utilizan altas concentraciones de azúcar en el sustrato.

Debido a estos factores de estrés, es importante seleccionar a una cepa ideal basándonos en la resistencia a la tolerancia a etanol.

Las células de las levaduras poseen sistemas para adaptarse o responder a condiciones de estrés usando sistemas que involucran la síntesis de moléculas de protección y la activación de señales de transducción que inducen a eventos secundarios que tienen la función de protección, y así de esa manera resistir al estrés provocado por las condiciones cambiantes a las que se enfrentan las levaduras en las fermentaciones.

La tolerancia de las levaduras al etanol, se ha correlacionado con la capacidad de las células de modificar la composición lipídica de su

membrana para responder al efecto de desorganización o ruptura de ésta provocada por el etanol; pues éste y las altas temperaturas, interfieren en la organización de la membrana incrementando su fluidez y permeabilidad a iones y a pequeños metabolitos e inhibiendo el transporte de nutrientes. Además, inhibe la actividad de algunas enzimas glicolíticas y se ha reportado que daña el DNA mitocondrial de las células de las levaduras y simula la actividad ATP asa.

Por otro lado, también se ha estudiado que la tolerancia al etanol de las levaduras, depende en gran medida de la composición del medio en el cual se evalúa, y se ha demostrado que algunos compuestos permiten la mejora en la productividad de alcohol, tal es el caso de los ácidos grasos insaturados, esteroides, proteínas, aminoácidos, vitaminas y iones metálicos o suplementos como harina de soya y peptona. Thomas *et al.*, (1979) reportan que al adicionar esteroides y ácidos grasos insaturados en las fermentaciones vinícolas se obtiene un incremento en la tolerancia al etanol por parte de *S. cerevisiae* como resultado de la incorporación de algunos de esos compuestos a su membrana. Piña *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de la adición de ergosterol y ácido oléico en cultivos anaeróbicos de levaduras y observaron la incorporación de estos lípidos a las membranas de las levaduras dando como resultado un aumento en la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae* y *H. guilliermondii*. Sin embargo, a pesar de extensos estudios, la tolerancia al etanol por parte de las levaduras todavía es complicada puesto que Lei *et al.*, (2007) se han propuesto que el mecanismo de la tolerancia al etanol varía dependiendo de la cepa de la levadura, las condiciones de cultivo y los procedimientos experimentales. Aguilera *et*

al.,(2007), sugiere que el mecanismo de las células para tolerar el etanol, es por medio de su habilidad para incrementar ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática, de hecho, ir aumentando la concentración de etanol en un medio de cultivo, aumenta la proporción de ácidos grasos monoinsaturados y fosfolípidos y decrecen los ácidos grasos saturados. La tolerancia al etanol se puede ver influenciada por los esteroides presentes en las membranas, pues el ergosterol hace a las levaduras más tolerantes con respecto a los otros esteroides, debido a que el ergosterol incrementa la rigidez de la membrana en presencia de etanol, puesto que juega el papel de regular el balance entre otros compuestos de la membrana como lípidos y proteínas (Aguilera *et al.*, 2007; Nabais *et al.*, 1998; Ingram y Buttke 1984; Leao y van Uden 1982,1984; Viegas *et al.*, 1989; Lei *et al.*, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado la habilidad de *Kluyveromyces marxianus* como productor de etanol a 42°C; y planteado una producción de etanol de 6% a partir de 35g/L de lactosa. Se han reportado rendimientos del 60.4% a partir de una fermentación con *Kluyveromyces marxianus* a 40° C; sin embargo, estos trabajos describen la actividad fermentativa de la levadura tanto sobre tejido lignocelulósico como sobre suero de leche y sobre jugo de caña de azúcar respectivamente.

De la misma manera Margaritis y Bajpai,(1982) han reportado que 8 cepas de *K. marxianus* tuvieron la capacidad de fermentar una aldopentosa a etanol después de 48 horas obteniéndose rendimientos del 55%, y Anderson, *et al.*, (1986) reportaron la habilidad de esta levadura para fermentar glucosa a etanol a altas temperaturas en soluciones de entre 15.5 y 20°Bx, condiciones que resultan ser ventajosas pues pueden reducir el costo de destilación y el riesgo de contaminación durante la fermentación. Además de las características mencionadas anteriormente, se ha reportado la presencia de *K. marxianus* durante el proceso de la elaboración del tequila; sin embargo, hasta donde sabemos no hay información relacionada a la importancia que pueda tener *K. marxianus* en la fermentación en mostos de tequila, por lo que es importante evaluar las aportaciones de este microorganismo en el destilado, en particular, determinar la cinética de crecimiento en las condiciones de los mostos para la producción de tequila, el etanol producido por dicha levadura, el rendimiento de la producción del mismo y la tolerancia que tiene *Kluyveromyces marxianus* al etanol producido durante la fermentación.

Además será importante determinar sus habilidades al producir tequila a 40°C ya que durante ciertos períodos durante la fermentación en la industria la temperatura puede llegar fácilmente a 40° C debido a las reacciones exotérmicas metabólicas de las levaduras durante su crecimiento (Ballesteros, *et al.*, 2004; Zafar, *et al.*, 2006; Limntong. S. *et al.*, 2007; Lachance, 1995; Kida *et al.*,1992).

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

- Evaluar el papel de *Kluyveromyces marxianus* en la fermentación de mostos de *Agave tequilana* Weber.

OBJETIVOS PARTICULARES:

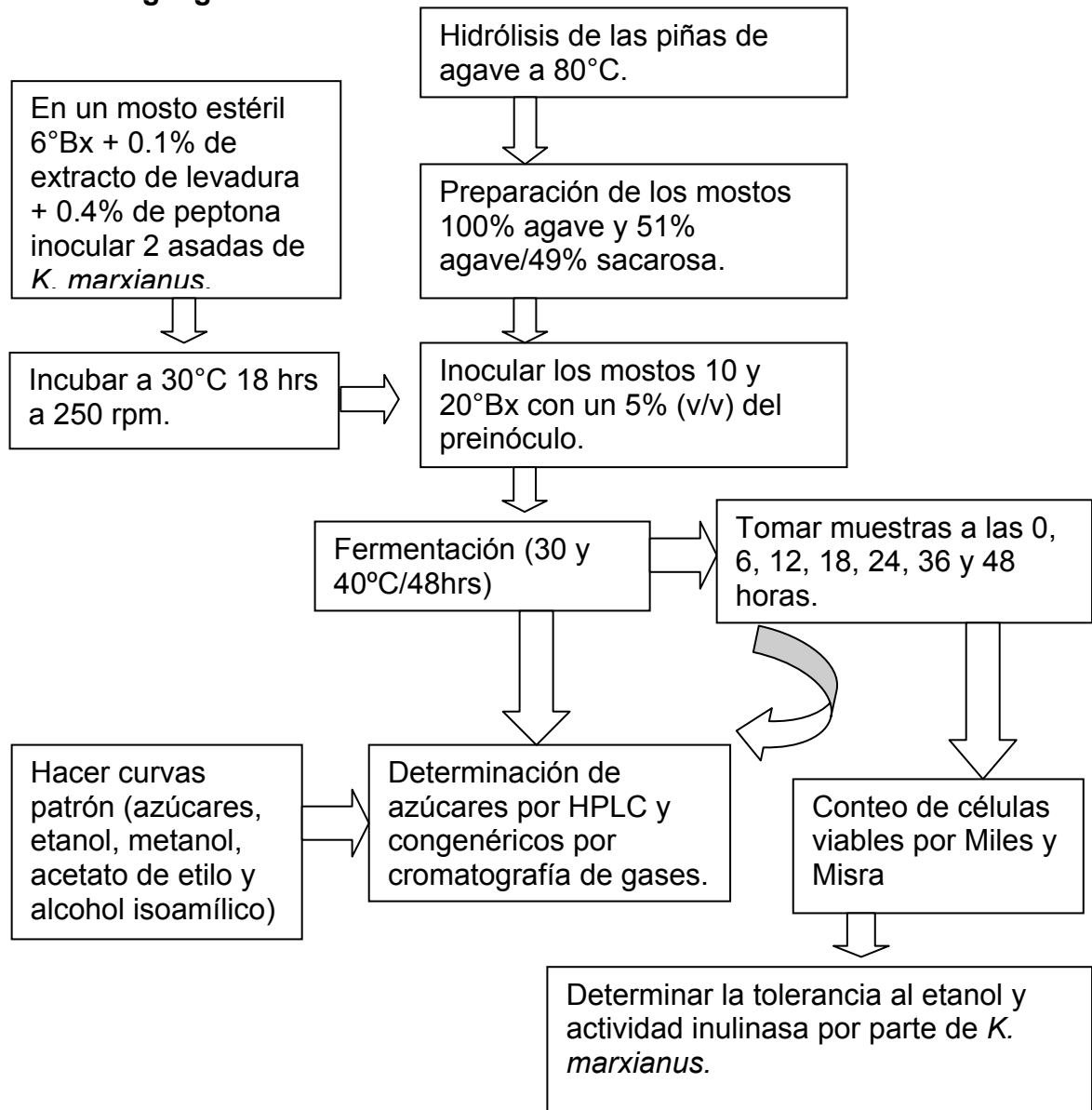
- Determinar el tiempo de hidrólisis de los polifruktanos del agave a 80°C.
- Evaluar el rendimiento del etanol producido a 30 y 40 °C por *K. marxianus* en mostos de *Agave tequilana* Weber en concentraciones de 10 y 20 °Bx empleando mostos 100% agave y 51% agave/ 49% sacarosa añadida y determinar los parámetros de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* bajo las mismas condiciones.
- Determinar metanol, alcohol isoamílico, etanol y acetato de etilo formados por *Kluyveromyces marxianus* en los mostos de 10 y 20 °Bx y fermentados a 30 y 40 °C.
- Determinar la tolerancia a etanol a un rango de 5 a 12%(v/v) de *Kluyveromyces marxianus*.

4. HIPÓTESIS

Si *Kluyveromyces marxianus* ha sido identificada durante el proceso de elaboración de tequila; entonces esta levadura juega un papel tanto en la producción de etanol como en la formación de algunos compuestos de sabor y olor del tequila aún bajo condiciones de altas temperaturas y alta concentración de azúcares.

5. MATERIALES Y METODOS

Metodología general



Hidrólisis del agave

Se cortaron 250g de trozos pequeños del tallo de *Agave tequilana Weber* fresco, de 7 años de edad originario de Querétaro, estos fueron introducidos en un matraz en donde se adicionaron 250mL de una solución al 0.01% de H₂SO₄, la acidez del agave en la solución se midió con papel hasta pH 4. Posteriormente, los matraces se colocaron en la autoclave (HIRAYAMA Amerex Instruments Inc.) para someterlos a una temperatura de 80°C durante 3, 6, 10, 20, y 24 hrs cada matraz.

Una vez terminado el tiempo de la hidrólisis se recuperó el líquido de los matraces y se procedió a extraer el jugo de los pequeños trozos de agave en un extractor de jugos (Turmix). Este jugo se mezcló con el líquido recuperado y después se midieron en un refractómetro los grados Brix obtenidos de los diferentes tiempos de hidrólisis.

Origen de *Kluyveromyces marxianus*.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo en una planta productora de tequila, se aisló é identificó a *Kluyveromyces marxianus*. La levadura fue identificada por API y con la secuencia del gen 26s ARNr y se mantuvo en un medio YM.

Preparación del preinóculo de *Kluyveromyces marxianus* en mostos diluidos de agave

Para la preparación del preinóculo se diluyó el mosto de agave a 6°Bx con agua destilada, a este se le adicionó 0.1% de extracto de levadura (BD Bioxon) y 0.4% de peptona (BD Bioxon) y se esterilizó durante 15 min a 121°C en un autoclave (HIRAYAMA Amerex Instruments Inc); una vez tenido este medio estéril y frío, se inocularon dos asadas de *Kluyveromyces marxianus* que se tenían de un cultivo sólido de 24 horas y se incubó en una incubadora (Lab-line) durante 18 horas a 30°C en agitación a una velocidad de 250rpm para alcanzar una población celular final de 10^6 UFC/ mL (Arrizon & Gschaedler, 2002).

Fermentación del mosto 100% agave.

A partir del mosto obtenido de la hidrólisis del agave (23 ° Bx) se diluyó con agua destilada hasta obtener mostos de 10 y 20 °Bx, posteriormente, se colocaron 400mL del mosto en matraces de 1L y se les adicionó 1% de extracto de levadura BD Bioxon, y se pasteurizaron en un autoclave (HIRAYAMA Amerex Instruments Inc) a 80 °C durante 15 min. El mosto se enfrió a temperatura ambiente y los matraces se inocularon con un 5% (v/v) del preinóculo. Los matraces se incubaron sin agitación en un horno (Riossa) a 30 °C y a 40 °C durante 48 horas tomándose 3mL de muestra cada 6 horas durante 24horas y cada 12 hasta las 48hrs con el fin de seguir la cinética de la fermentación.

Fermentación del mosto 51% agave 49% sacarosa añadida.

A partir del mosto obtenido de la hidrólisis de la piña de agave se hizo el cálculo para determinar la cantidad de sacarosa (SIGMA) que se agregaría para cada caso de concentración de azúcares. Se prepararon los mostos para ajustarlos a una concentración final de 10 y 20 °Bx. Para 10 °Bx se adicionaron 19.6 g de sacarosa y 39.2g para 20 °Bx. Finalmente se realizó la misma metodología que para los mostos 100% agave.

Toma de muestras a lo largo de la fermentación.

Antes de iniciar con la toma de muestras se esterilizó el material que se empleó durante 15 min a 121 °C en el autoclave y la campana de flujo laminar se limpió con una solución de etanol al 70% antes de ser utilizada. Con una pipeta automática se tomaron 3mL de muestra y se colocaron en tubos de ensayo estériles que fueron tapados con torundas de algodón y papel aluminio y se llevaron a congelación hasta antes de ser analizados.

Conteo de células viables a lo largo de la fermentación

A partir de las muestras tomadas a lo largo de la fermentación, se llevaron a cabo diluciones decimales con agua estéril peptonada al 0.1% y de estas diluciones se agregó 1µL por triplicado en cajas petri con medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona BD Bioxon y 2% de glucosa). Las cajas fueron incubadas en el horno a 30°C en períodos de entre 24 y 48 horas para

posteriormente ser contadas y así determinar el número de células viables (Ramírez-Gamma, 1996).

Determinación de azúcares y etanol por cromatografía de gases y líquidos.

Medición de etanol y azúcares por HPLC:

La medición de los azúcares y etanol por medio de HPLC utilizando un cromatógrafo Waters con una bomba de la misma marca, se usó el programa Chemstation para la visualización de los resultados, y la corrida de las muestras se llevó a cabo con una columna Shodex (RSpak Kc-811) de intercambio iónico usando como fase móvil H_3PO_4 0.01N a un flujo de 1mL/min y a una temperatura del horno (Perkin Elmer) a 40 °C. Para llevar a cabo la detección se empleó un detector de índice de refracción IR (Perkin Elmer).

Se prepararon soluciones estándar de sacarosa (SIGMA), fructosa (SIGMA), inulina (SIGMA), glucosa (SIGMA) y etanol grado HPLC (J.T Baker) a concentraciones de 0.06-1% para hacer la curva patrón. (Anexo1)

Estas disoluciones se prepararon con agua desionizada que fue sometida al sonicador durante 25 min y filtrada en un filtro Millipore con un tamaño de poro de 0.22 μm , e inyectadas a un loop de 20 μL .

Para la obtención de la concentración de las muestras, se interpolaron los valores obtenidos de los cromatogramas.

Preparación de las muestras tomadas a los diferentes tiempos de fermentación para su inyección al HPLC

De las muestras que se tomaron en los diferentes tiempos de la fermentación se les congeló y posteriormente se les descongeló para ser sometidas a centrifugación en una centrifuga (Beckman) a 15000rpm y posteriormente fueron filtradas en un filtro Millipore con un poro de 0.22 μm , este procedimiento se repitió 2 veces. Las muestras fueron inyectadas a un loop de 20 μL . Todas las inyecciones se llevaron a cabo por triplicado.

Determinación de etanol, metanol, acetato de etilo y alcohol isoamílico por cromatografía de gases

Esta determinación se llevó a cabo en un cromatógrafo GC 6890 de Agilent technologies con un detector FID y una columna capilar INOWAX. El método que se usó para determinar los compuestos del destilado requirió de una rampa de temperaturas donde la temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante un minuto, 150 °C 3 minutos y finalmente llegar a 200 °C durante el tiempo restante de la corrida; la duración total de la corrida de separación fue de 21 min.

Los flujos de los gases empleados fueron los siguientes: gas acarreador 5 mL / min, aire 400 mL / min, y H₂ de 40 mL /min.

Las muestras se inyectaron de manera automática, pero para poder hacer su identificación y su cuantificación se inyectaron estándares de los compuestos

a determinar. El análisis de los datos se realizó en el software chemstation (Agilent USA). (Anexo 2)

Preparación de las muestras obtenidas al final de la fermentación para su posterior determinación de compuestos congénicos por cromatografía de gases.

A) Destilación:

Se destilaron las 8 diferentes fermentaciones que se llevaron a cabo una sola vez usando un equipo de destilación de vidrio, la destilación se llevó a cabo a una temperatura no mayor de 60 °C empleando como refrigerante agua circulante a 5 °C, esto se hizo hasta concentrar el etanol a un 35 %.

B) Cuantificación por CG:

Las muestras fueron filtradas en un filtro Millipore Millex-HN de nylon de 0.45µm. Posteriormente se colocaron en viales para CG y así poder ser inyectadas automáticamente por el equipo; las inyecciones se hicieron por triplicado.

Evaluación de la tolerancia a etanol de *Kluyveromyces marxianus*.

Primero se puso a crecer a *Kluyveromyces marxianus* en YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona BD Bioxon y 2% de glucosa) y se incubó en agitación a 180rpm a 30 °C durante 24 horas; posteriormente para mantener a las levaduras en su fase exponencial de crecimiento, se tomaron 2.5mL de

ese preinóculo y se llevaron nuevamente a medio YPD que fue incubado bajo las mismas condiciones (se repitió el procedimiento 2 veces). Una vez que se tiene este cultivo, se le midió la absorbancia a 610nm en un espectrofotómetro GBC modelo CINTRA 101 y partir de un cultivo con absorbancia menor a 1, se hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} para ser sembrados.

Finalmente se prepararon medios YPD sólidos adicionados de etanol 5 - 12% (v/v) y se sembraron las diluciones de microorganismos anteriormente hechas (Carrasco *et al.*, 2002).

Preparación del medio con etanol

Se preparó en un matraz de un litro 400mL de medio YPD sólido (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% de glucosa y 1.5 % de agar). Este medio se preparó esterilizando todos los reactivos (excepto la glucosa) a 121° C durante 15 min en autoclave; la glucosa se esterilizó por filtración en un filtro de nylon Millipore Millex-HN de 0.45 μ m y se le adicionó al medio después de haber sido esterilizado. Después de esto se vaciaron 25 mL de este medio en cajas petri y posteriormente se adicionaron los volúmenes de etanol requerido según la concentración deseada cuando la temperatura del medio estaba a 40°C aproximadamente. Una vez adicionado el etanol las cajas se movieron en círculos para homogeneizar la mezcla e inmediatamente después de ello, se taparon las cajas y se sellaron con parafilm para evitar que se evaporara el etanol. Una vez sólido el medio

entonces, se procedió a sembrar las levaduras en condiciones asépticas por el método de Miles y Misra (Ramírez-Gamma,1996).

Las adiciones de etanol se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Para preparar las cajas al 5% se le adicionó 1.25mL de etanol en 25mL de medio, para preparar al 6% se adicionó 1.5mL de etanol en 25 mL de medio, para el 7% se adicionó 1.75mL de etanol, para 8% 2mL, para 9% 2.25mL, para10% 2.5mL, para11% 2.75mL y para 12% se le adicionaron 3mL de etanol.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hidrólisis de los tallos de agave en 0.01% v/v de H₂SO₄ y 80°C

En este ensayo se determinó la cantidad de °Bx de los jugos de los tallos de agave a diferentes tiempos de hidrólisis ácida a una temperatura de 80 °C para determinar el tiempo adecuado para poder obtener la mayor cantidad de azúcares reductores y poder llevar a cabo posteriormente la fermentación con *K. marxianus*.

En la figura 7 se observa que después de tres horas de hidrólisis, se logran obtener 9 °Bx y a las 6 horas, se obtuvieron 11 °Bx, lo que significa que transcurrido este tiempo, ya ha habido una conversión parcial de los fructanos de las piñas de agave; sin embargo, esta conversión es insuficiente para llevar a cabo una fermentación que genere buenos rendimientos, pues hay menor cantidad de azúcares fermentables que los deseados y en consecuencia, habría una producción menor de etanol.

A las 10 horas de la hidrólisis los °Bx del mosto se incrementaron hasta 16 °Bx a diferencia de los que se obtuvieron a los tiempos de 3 horas y 6 horas; esto se debe a que a medida que se incrementó el tiempo fue aumentando la cantidad de polifructanos hidrolizados.

Este ensayo se realizó a una temperatura constante de 80 °C para poder determinar el tiempo óptimo de hidrólisis de los polifructanos, a esta temperatura se obtuvo como el tiempo ideal 10 horas, debido a que después de haber transcurrido este tiempo, los grados Brix se mantienen prácticamente constantes (véase figura 7). Además, en los tiempos de hidrólisis posteriores, la coloración del mosto comienza a ser más oscura lo

cual puede ser indeseable puesto que la oscuridad en el mosto es un indicador de que se están llevando a cabo reacciones de Maillard y de caramelización de los azúcares resultando en una pérdida de azúcares fermentables. Al ocurrir las reacciones mencionadas, comienzan a producirse compuestos que pueden ser tanto deseables como indeseables para la producción del tequila, tal es el caso del HMF (hidroxi metil furfural) y otros furfurales que a pesar de ser compuestos que aportan sabor dulce al tequila también tienen efectos inhibitorios en las levaduras puesto que provocan efectos negativos en la velocidad de la fermentación, en la velocidad de crecimiento y en la composición celular.

A pesar de no haber llevado a cabo la hidrólisis sin la adición de ácido, se recomienda llevarla a cabo a pH ácido, ya que se ha reportado en estudios previos que a pH ácido, los efectos negativos provocados por las reacciones de Maillard se ven casi eliminados (Hofmann *et al.*, 2000; Waleckx *et al.*, 2008).

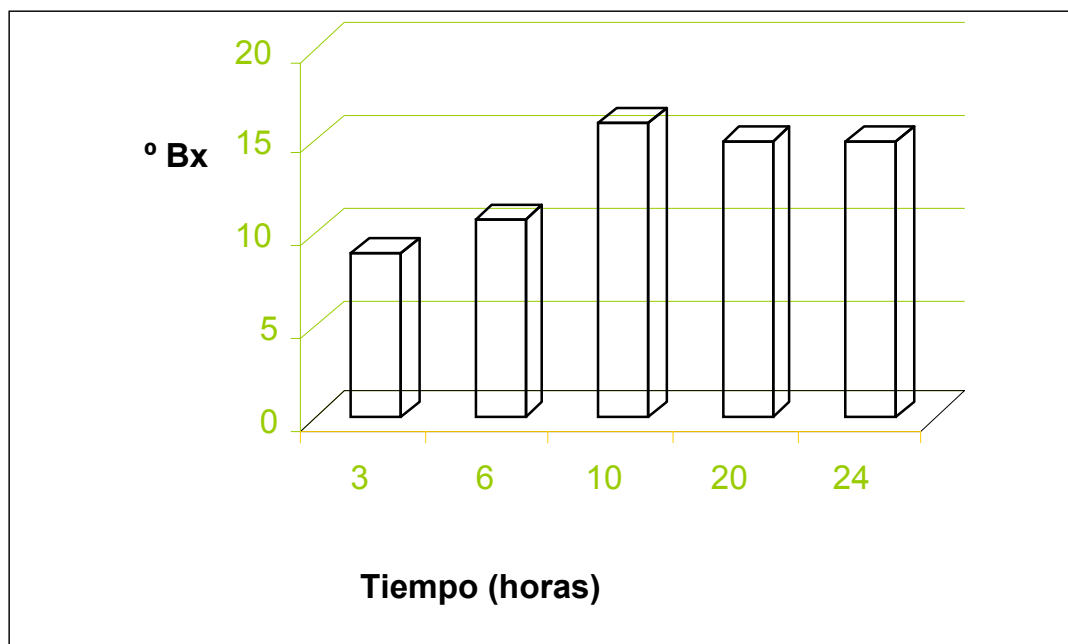


Figura 7. Determinación de los °Bx, medidos en un refractómetro, después de la hidrólisis de los tallos de agave después de 3, 6, 10, 20 y 24 horas de hidrólisis a 80 °C y 0.01% de H₂SO₄.

Cinética de la fermentación

Condiciones trabajadas para la realización de este ensayo.

Figura	Condiciones de fermentación
9	Mosto 100% agave, 20 °Bx, 30 °C.
10	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 20 °Bx, 30 °C.
11	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 10 °Bx, 30 °C.
12	Mosto 100% agave, 10 °Bx, 30 °C.
13	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 10 °Bx, 40 °C.
14	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 20 °Bx, 40 °C.
15	Mosto 100% agave, 20 °Bx, 40 °C.
16	Mosto 100% agave, 10 °Bx, 40 °C.

Tabla 1. Muestra las condiciones a las que se llevaron a cabo las fermentaciones.

En este ensayo, se determinó la cinética de las fermentaciones y se observó que en las ocho fermentaciones llevadas a cabo (ver figura 8), no existe la desaparición total de los azúcares iniciales para convertirse en productos. Se observó que *Kluyveromyces marxianus* va consumiendo los sustratos a diferente velocidad debido, probablemente, al tamaño de los azúcares puesto que en las fermentaciones con mostos 100% agave (ver figura 9, 12, 15 y 16) hubo un consumo total de la glucosa, posteriormente hubo consumo parcial de fructosa y finalmente la sacarosa. En el caso de las fermentaciones que se llevaron a cabo en mostos 51% agave 49% sacarosa (ver figura 10, 11, 13 y 14), se observó que ninguno de los azúcares fue consumido en su totalidad; sin embargo, la preferencia por el consumo de los azúcares es inicialmente por la fructosa, luego la glucosa y finalmente la sacarosa (prácticamente no se consume), lo que posiblemente indique que *Kluyveromyces marxianus* use preferentemente monosacáridos como fuente de carbono. A pesar de que la literatura reporta que *Kluyveromyces marxianus* tiene actividad inulinasa; durante la fermentación no se nota que exista hidrólisis de inulina y esto es debido a que existen en los mostos otras fuentes de carbono que para la levadura es más fácil consumir, tal es el caso de los monosacáridos fructosa y glucosa.

A partir de los datos observados en las figuras 9 - 16, se puede concluir que el origen de la fuente carbono en los mostos, modifica el comportamiento de *Kluyveromyces marxianus* durante la fermentación, ya que cuando no hay adición de sacarosa en el medio, la levadura tiene la capacidad de producir mayor cantidad de etanol que en los medios adicionados de sacarosa. Por lo que la única ventaja que implica agregar sacarosa en un medio de

fermentación con *Kluyveromyces marxianus*, es que esa fuente de carbono es más barata que la proveniente de la hidrólisis del agave.

Paralelamente a este ensayo se pudo observar el efecto de la temperatura sobre las fermentaciones. En las figuras 9 a 12 se muestra la cinética de la fermentación a 30 °C donde se observa una menor producción de etanol con respecto a las fermentaciones llevadas a cabo a 40 °C (figuras 13 - 16). Además se observó que *Kluyveromyces marxianus* consumió mayor cantidad de azúcares en las fermentaciones a 40 °C con respecto a las fermentaciones a 30 °C, con lo que se puede corroborar la característica termorresistente que algunos autores han reportado sobre *Kluyveromyces marxianus*.

Adicionalmente en el conteo de las levaduras, se observó que en todas las fermentaciones, hubo el mismo aumento en el número de células debido a que estas se encuentran en un medio favorable durante la misma, puesto que en este medio no hubo anaerobiosis estricta. La manera en la que se llevó a cabo este ensayo permitió que hubiera O₂ en los mostos pues el medio fue cerrado únicamente con torundas de algodón por lo que estas condiciones fueron ideales para que se incrementara la concentración de levaduras (ver figuras 9 -16). Lo mencionado anteriormente, está relacionado con la clasificación que algunos autores reportan sobre *Kluyveromyces marxianus* ya que es clasificada como una levadura fermentativa facultativa dado que no crece en condiciones de anaerobiosis estricta y que la producción de etanol está prácticamente ligada a la presencia de oxígeno en el medio donde se lleva a cabo la fermentación. Es por ello que *Kluyveromyces marxianus* en

una fermentación del tipo industrial contribuiría con sus productos en zonas en las que exista una concentración más elevada de oxígeno, ya que de lo contrario, su producción de etanol y otros subproductos se podría ver disminuida.

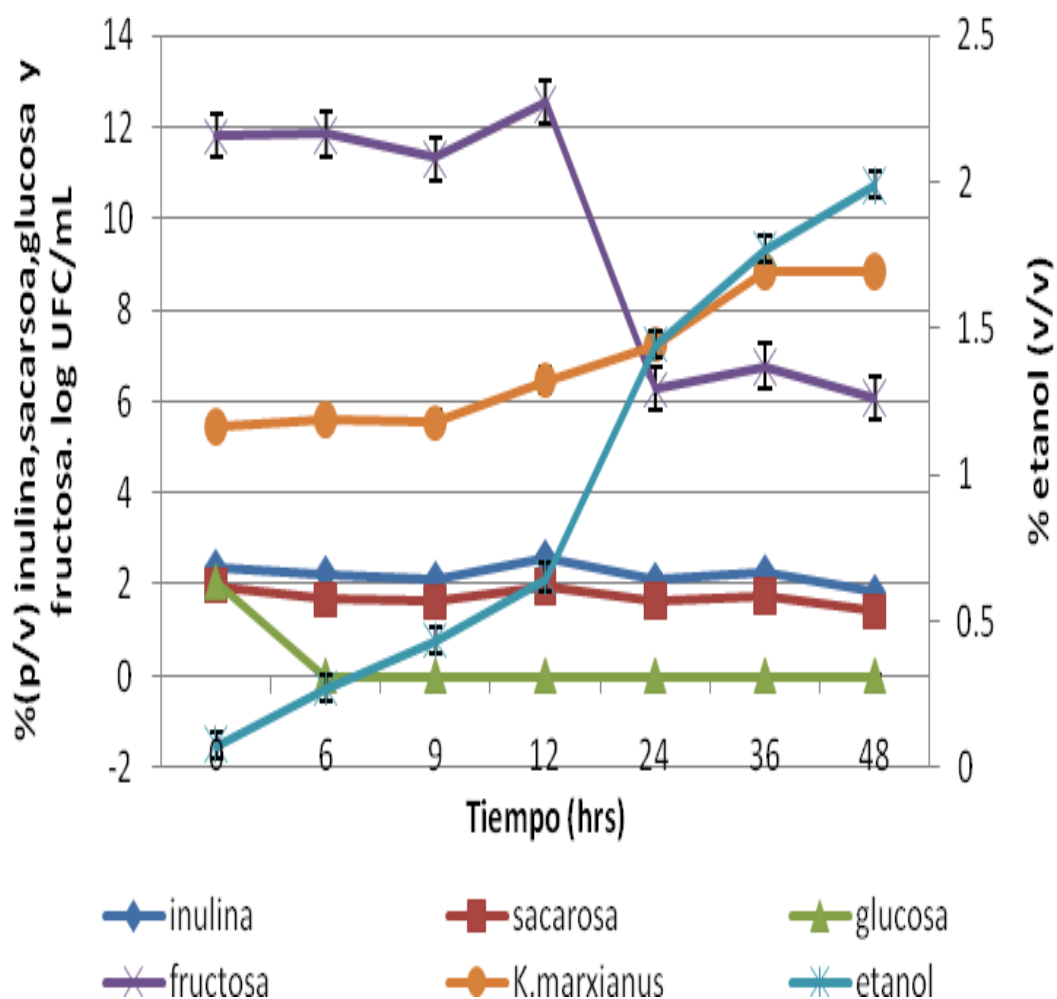


Figura 9. Cinética de la fermentación llevada a cabo por *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 100% agave a una concentración de 20 °Bx y una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

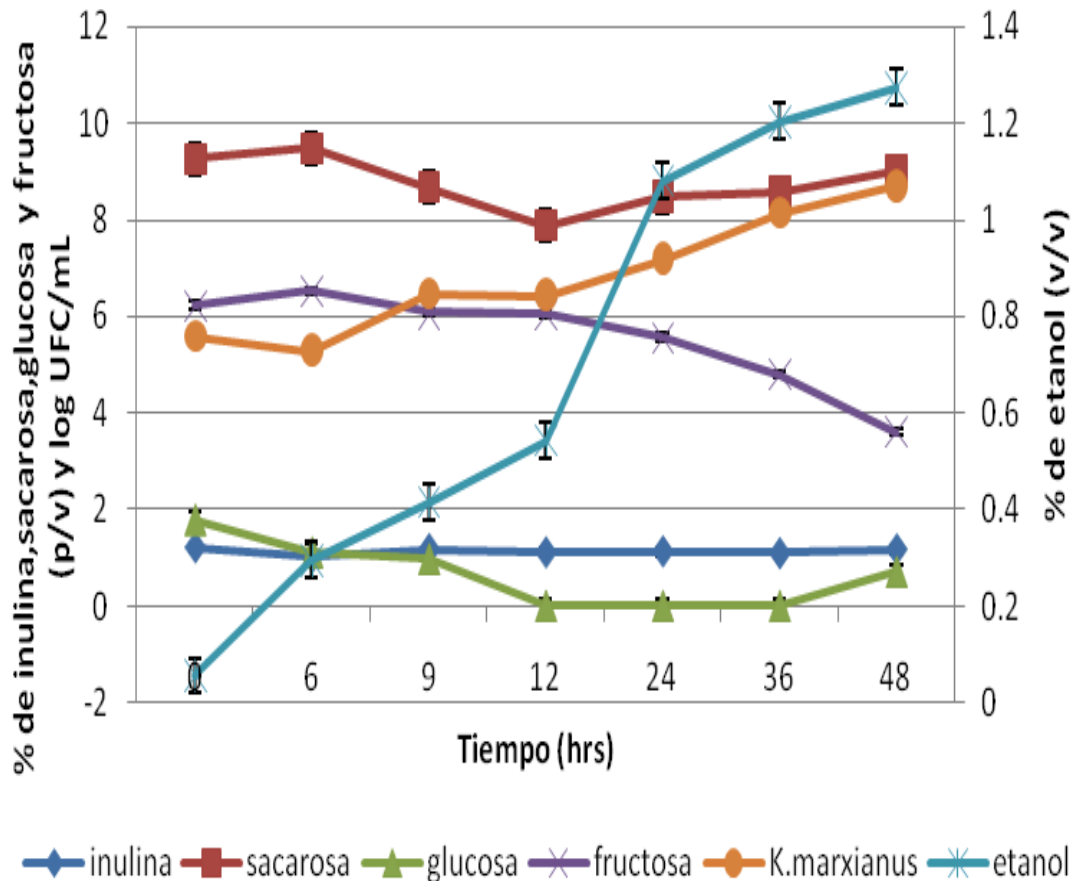


Figura 10. Cinética de la fermentación por *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 51% agave 49% sacarosa a una concentración de 20 °Bx y una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40°C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

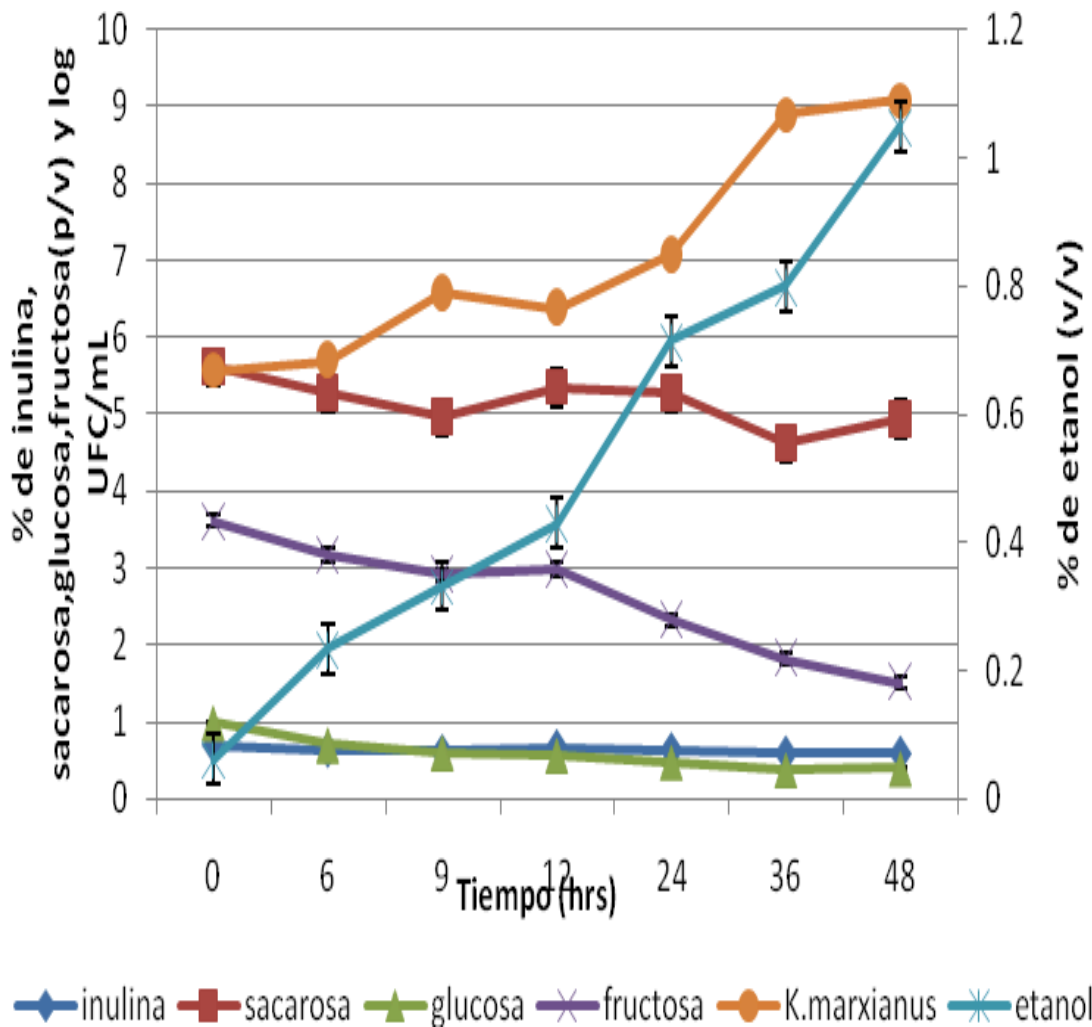


Figura 11. Fermentación por *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 51% agave 49% sacarosa añadida con una concentración de azúcares de 10 °Bx y a una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40°C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

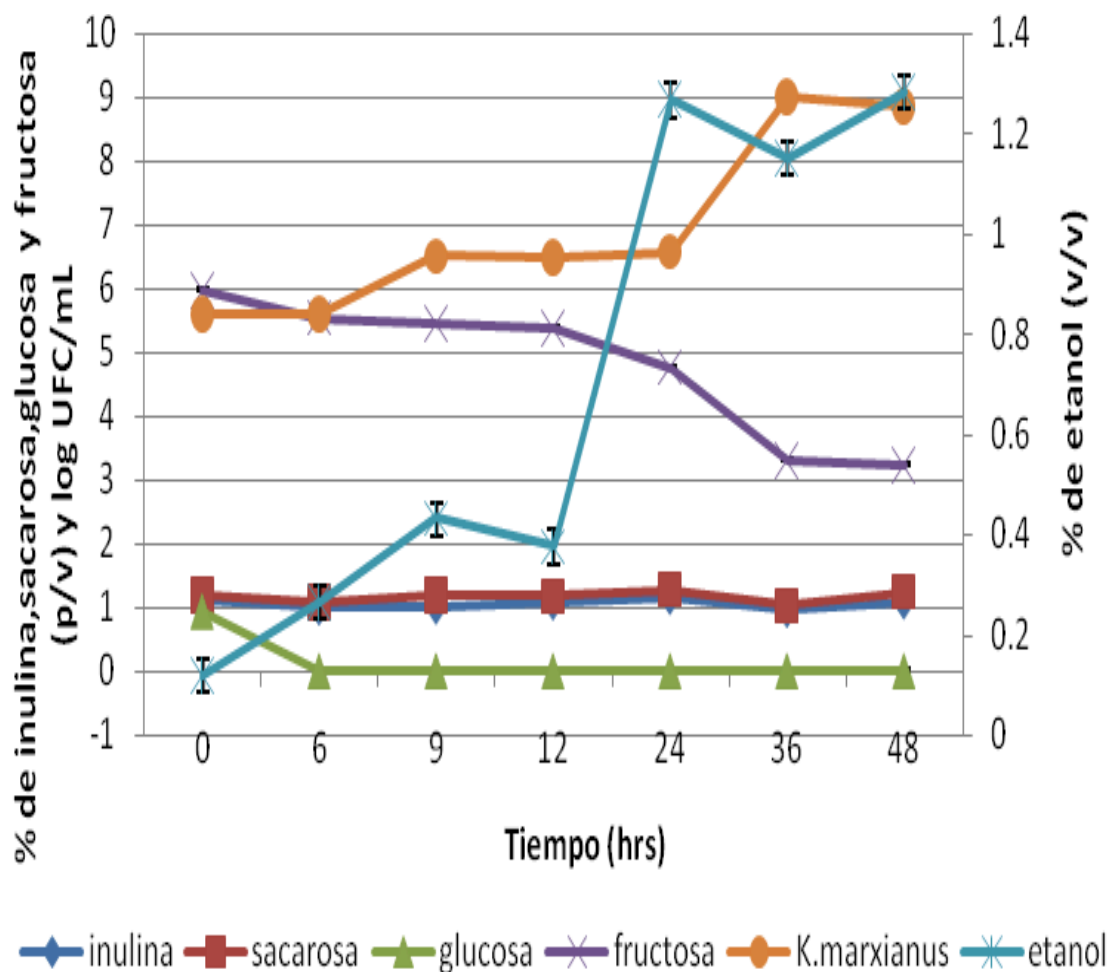


Figura 12. Describe la fermentación por *Kluyveromyces marxianus* durante 48 horas en un mosto 100% agave con una concentración de azúcares de 10 °Bx a 30 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

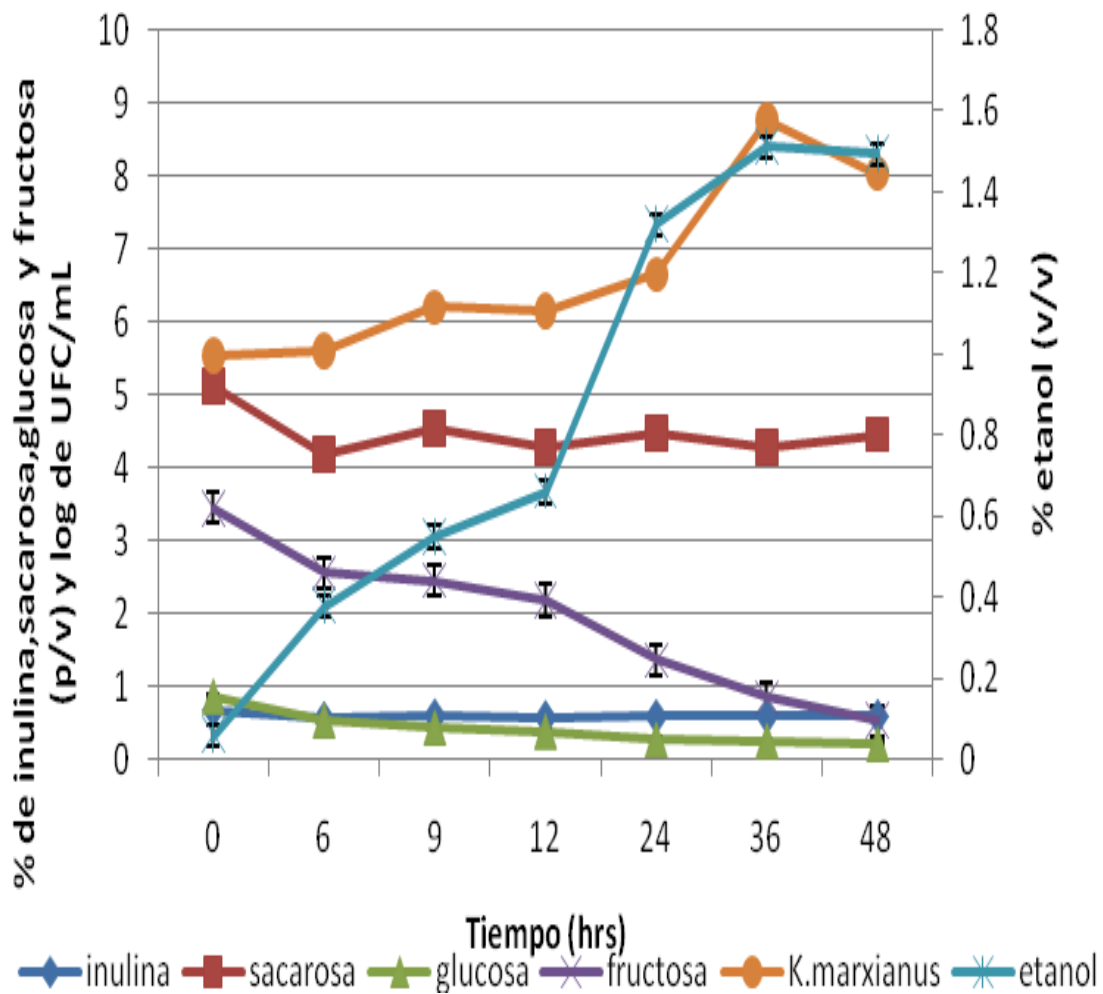


Figura 13. Describe la fermentación llevada a cabo por *Kluyveromyces marxianus* durante 48 horas en un mosto 51% agave 49% sacarosa añadida a una concentración de 10 °Bx y una temperatura de 40 °C. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

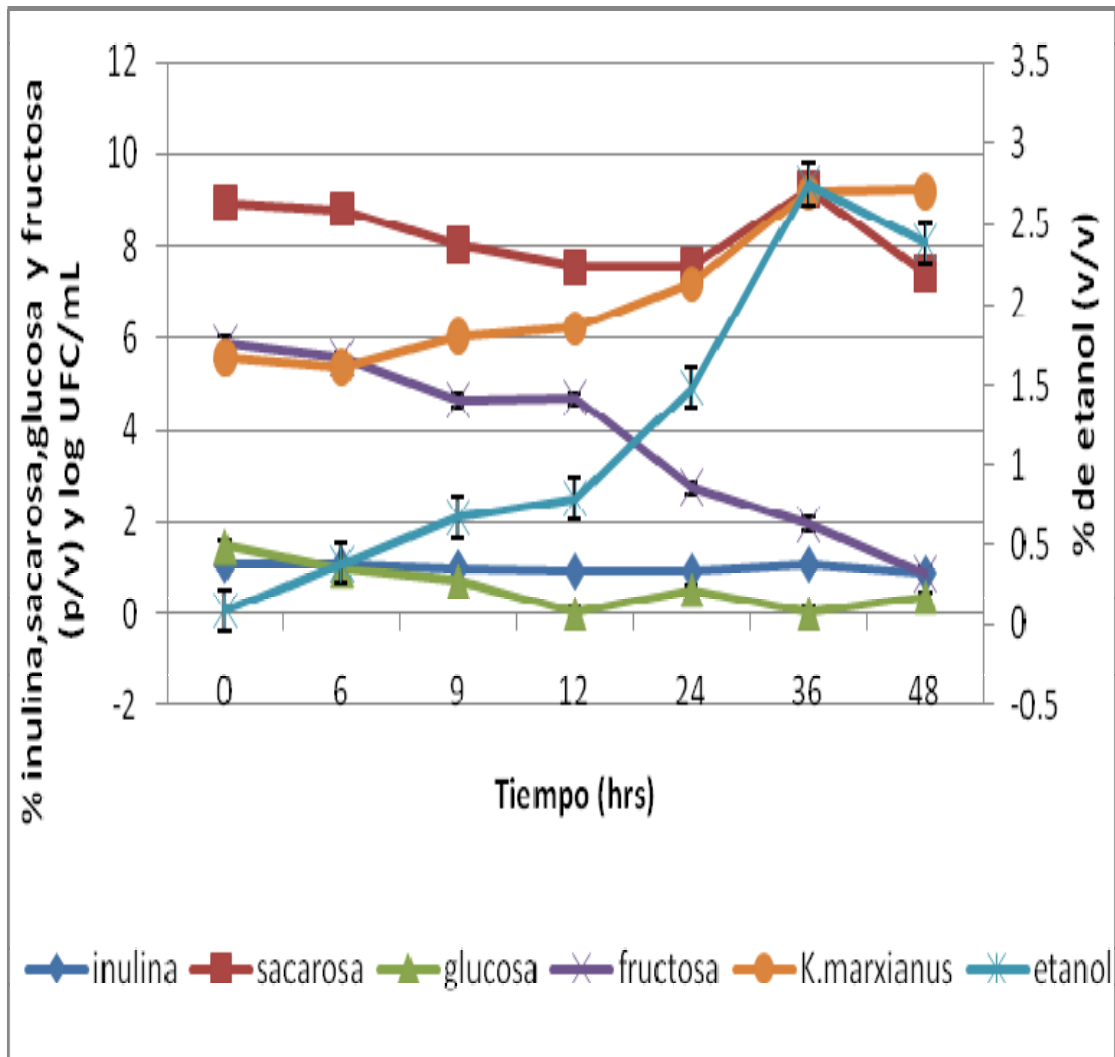


Figura 14. Describe la fermentación por *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 51% agave 49% sacarosa a una concentración de 20 °Bx y una temperatura de 40 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

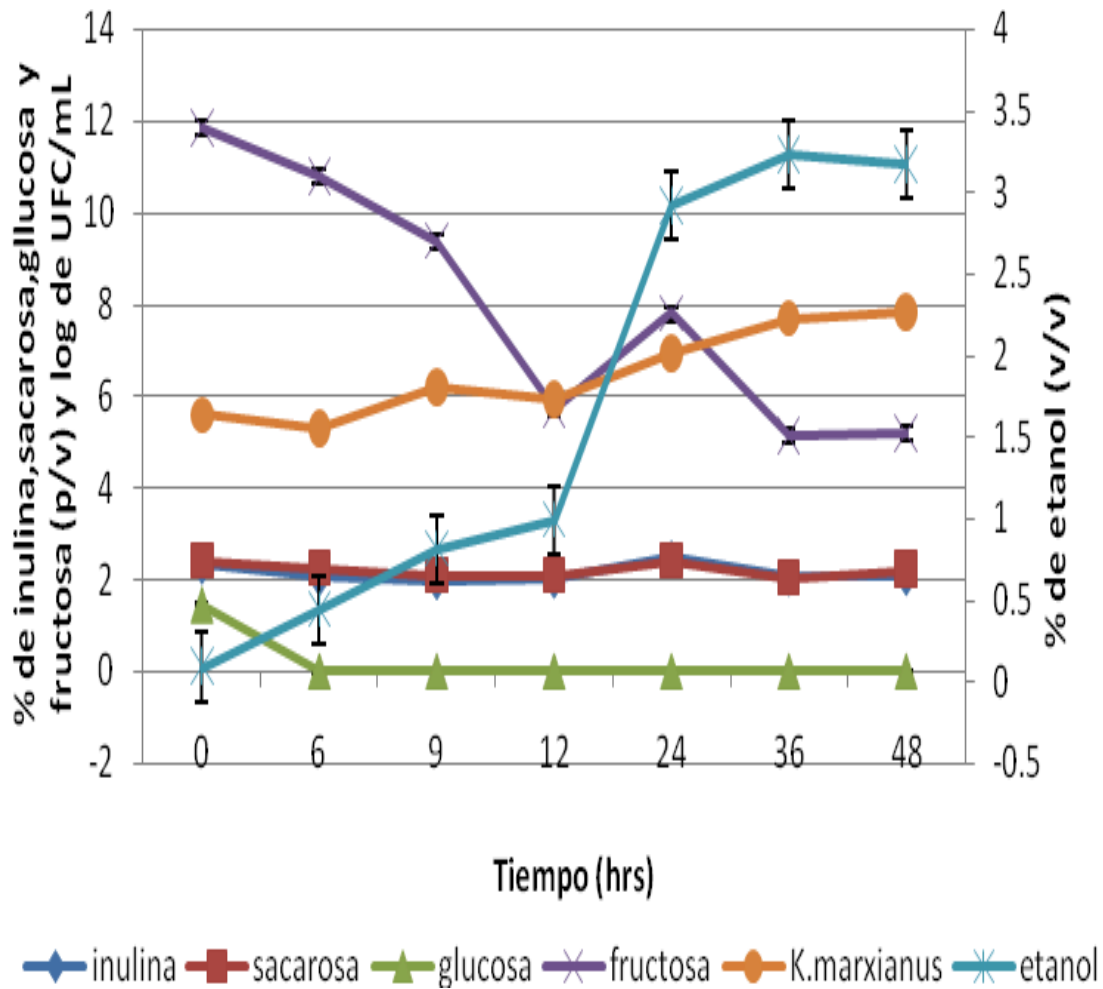


Figura 15. Describe la fermentación llevada a cabo con *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 100% agave a una concentración de 20 °Bx y una temperatura de 40 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

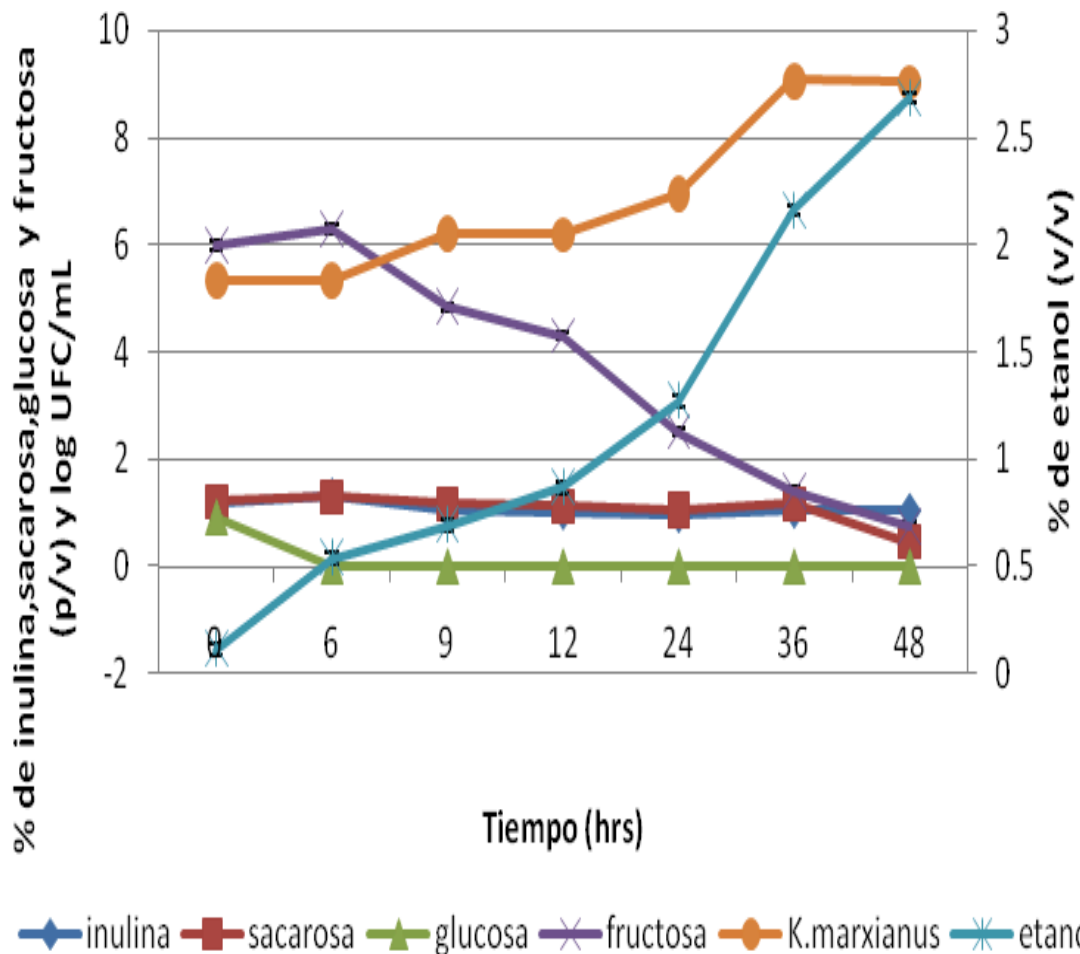


Figura 16. Describe la fermentación llevada a cabo con *Kluyveromyces marxianus* en un mosto 100% agave a una concentración de 10 °Bx y a una temperatura de 40 °C durante 48 horas. Los valores de la concentración de los azúcares y etanol se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C, los valores de los azúcares están referidos en % (p/v) en tanto que los de etanol se encuentran referidos en % (v/v) y, la cuenta de *Kluyveromyces marxianus* se determinó por cuenta en placa en medio YPD.

Determinación de azúcares y etanol al final de la fermentación

La determinación de azúcares y etanol al final de la fermentación se llevó a cabo para obtener la información necesaria para calcular los rendimientos de la producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* en los diferentes medios de fermentación.

En la figura 17, se observa la concentración porcentual obtenida después de 48 horas de fermentación con *Kluyveromyces marxianus* en mostos de *Agave tequilana Weber* bajo condiciones de temperatura de 30 °C y 40 °C y concentraciones de azúcares de 10 °Bx y 20 °Bx. De esta figura, se obtuvieron como resultados diferentes concentraciones de etanol, donde la más alta aquella en la que la fermentación se llevó a cabo con un mosto 100% agave con una concentración de azúcares de 20 °Bx y 40 °C donde se generó 3.24% de etanol (v/v). Posteriormente, la fermentación a 10 °Bx y 40 °C con azúcares provenientes únicamente del agave, *K. marxianus* produjo 2.68% de etanol (v/v), luego aquella que se hizo con un mosto a 20°Bx y 40 °C con 51% de azúcares provenientes del agave y 49% de azúcares añadidos donde se produjo 2.37% de etanol (v/v). Después en el mosto 20 °Bx y 30 °C 100% agave produjo 2 % de etanol (v/v) y, finalmente, en los otros 4 medios de fermentación *K. marxianus* produjo concentraciones menores a 1.5% de etanol (v/v) siendo las primeras mencionadas las cuatro mejores condiciones para producir etanol. Como se puede notar en la figura 17, tres de estas fermentaciones fueron llevadas a cabo a 40 °C lo que indica que *Kluyveromyces marxianus* en términos de fermentaciones alcohólicas, trabaja mejor a 40°C, es decir, es una levadura termotolerante

dado que en las condiciones de fermentación trabajadas a 30 °C, los porcentajes de etanol obtenidos de la fermentación fueron más bajos que los obtenidos a 40 °C.

En las figuras 20 y 21 se exponen los rendimientos obtenidos de cada una de las fermentaciones realizadas y por los datos expuestos en los gráficos, se corrobora que los mejores rendimientos para la producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* se obtuvieron en las fermentaciones llevadas a cabo a 40°C y que el mejor rendimiento para la producción de etanol es empleando un mosto con una concentración de 10°Bx que contenga azúcares reductores provenientes del agave.

Otra característica importante que se arroja de la determinación de azúcares y etanol al final de la fermentación se muestra en la figura 17, donde se observa que *Kluyveromyces marxianus* puede producir mayor cantidad de etanol en mostos que contengan azúcares reductores provenientes únicamente del agave, ya que los porcentajes más bajos de etanol obtenidos provienen de las fermentaciones en las que se adicionó 49% de sacarosa. Lo anterior puede corroborarse haciendo una comparación entre la figura 18 y 19, donde se muestra el porcentaje de azúcares consumidos en mostos 100% agave y mostos 51%agave/49% sacarosa respectivamente, donde se observa que en las 8 fermentaciones llevadas a cabo no hubo consumo total de la sacarosa. Sin embargo, es importante notar que *Kluyveromyces marxianus* tampoco consumió totalmente los otros azúcares reductores salvo la glucosa que en las fermentaciones llevadas a cabo en mostos 100% agave fue metabolizada completamente. A pesar de no haberse consumido

totalmente la sacarosa, en estos casos, el consumo de sacarosa fue mayor comparado con los mostos 51% agave/49% sacarosa. Otra situación ocurrida fue que en las fermentaciones añadidas de sacarosa, fue más fácil para *Kluyveromyces marxianus* metabolizar la fructosa, ya que en estos casos es menor el porcentaje de consumo de sacarosa que el consumo de fructosa. De aquí que *Kluyveromyces marxianus* lleve a cabo la fermentación con mejores rendimientos en mostos 100% agave.

En este ensayo se pudieron determinar adicionalmente los rendimientos producto/ biomasa ($Y_{p/x}$) y biomasa/ sustrato ($Y_{x/s}$) que se muestran en las figuras 22 y 23 respectivamente. A partir de la figura 22 se puede observar que las mejores condiciones para producir etanol en una fermentación es a 20 °Bx en un mosto 100% agave ya que en este gráfico se muestra que bajo estas condiciones la relación entre los gramos de etanol sobre los gramos de biomasa producida es grande; es decir, bajo estas condiciones se genera más etanol que biomasa durante la fermentación. Si se hace una comparación de estos datos con los obtenidos de la figura 17, se puede observar que la condición mencionada es en la que hubo una mayor producción de etanol; sin embargo, en la figura 21 ésta, es la segunda mejor condición para producir etanol.

Posteriormente en la figura 23 se muestra el rendimiento biomasa/ sustrato donde se muestra que la mejor condición para producir biomasa es en mostos 100% agave a una concentración de 10 °Bx y a 40 °C. Dado que no deseamos producir biomasa, entonces se puede concluir que la condición ideal para producir etanol es haciendo una fermentación con un mosto 100 %

agave a una concentración de 20 °Bx a 40 °C puesto que en esta condición se produce mayor cantidad de etanol sobre la cantidad de biomasa.

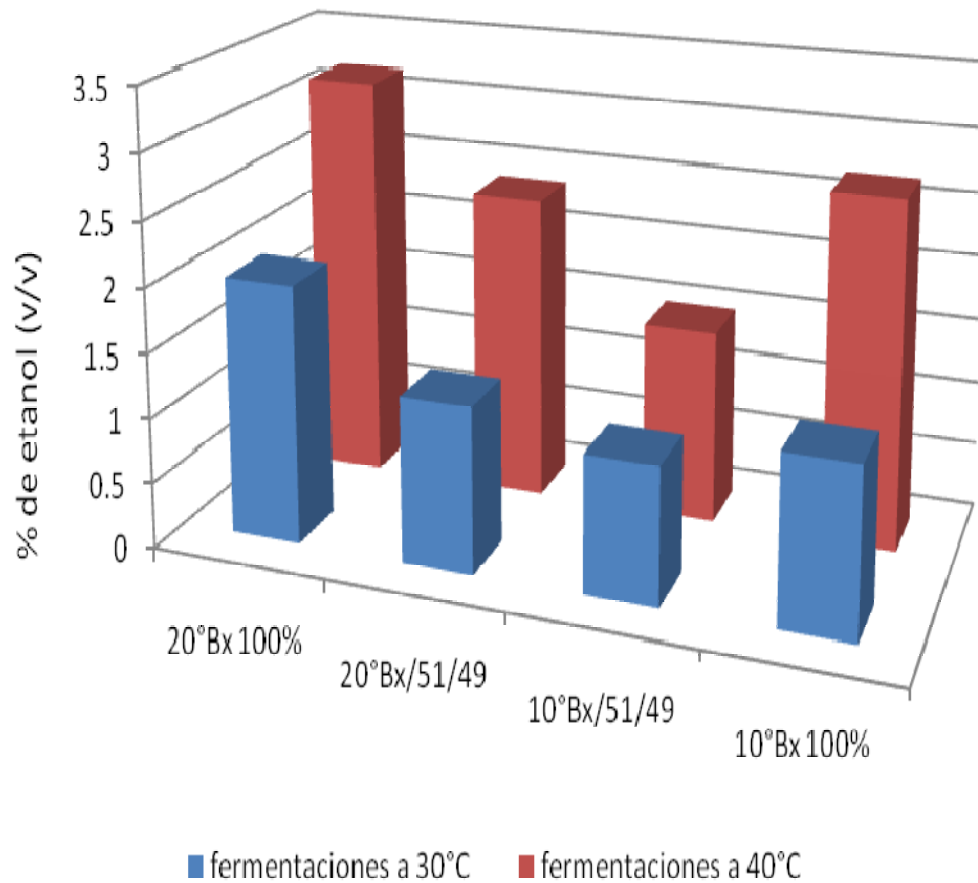


Figura 17. Porcentaje de etanol v/v producido por *Kluyveromyces marxianus* después de 48 horas de fermentación. Los valores de la concentración de etanol se obtuvieron por HPLC.

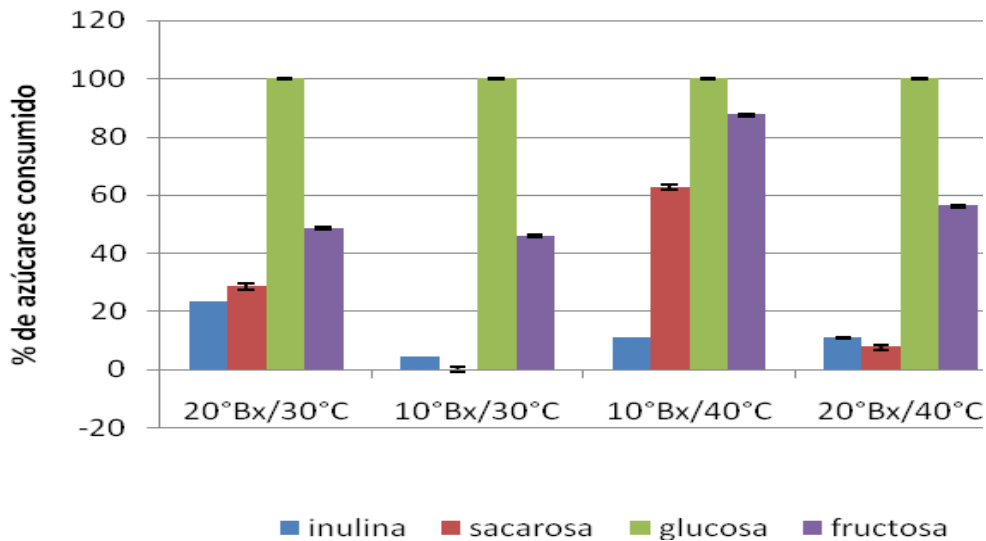


Figura 18. Muestra el porcentaje de azúcares consumidos en la fermentación con *Kluyveromyces marxianus* en mostos 100% agave. Los valores de la concentración de todos los azúcares se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C.

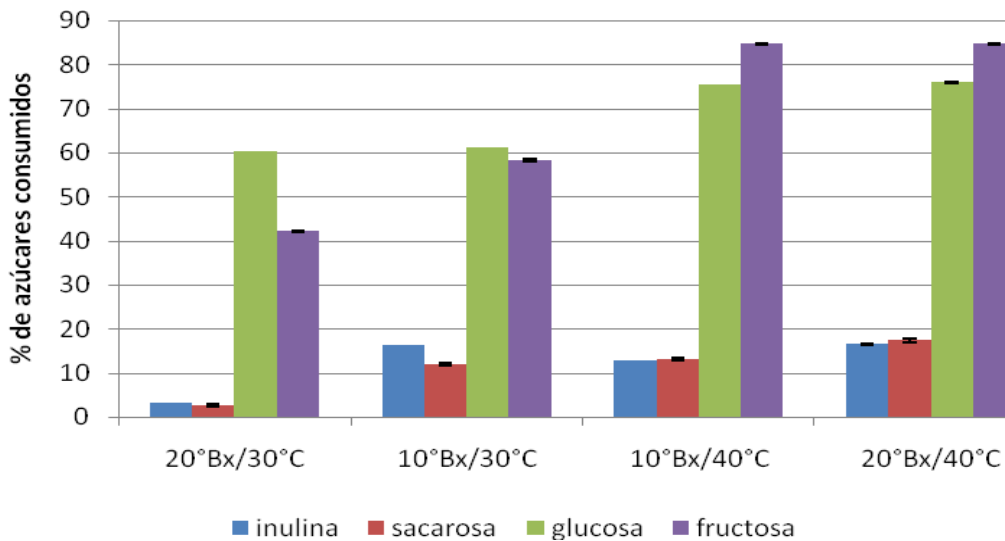


Figura 19. Muestra el porcentaje de azúcares consumidos en la fermentación con *Kluyveromyces marxianus* en mostos 51% agave/49% sacarosa. Los valores de la concentración de todos los azúcares se obtuvieron por HPLC con una columna Shodex (RSpak Kc-811) con H₃PO₄ 0.01N como fase móvil a un flujo de 1mL/min y la temperatura del horno a 40 °C.

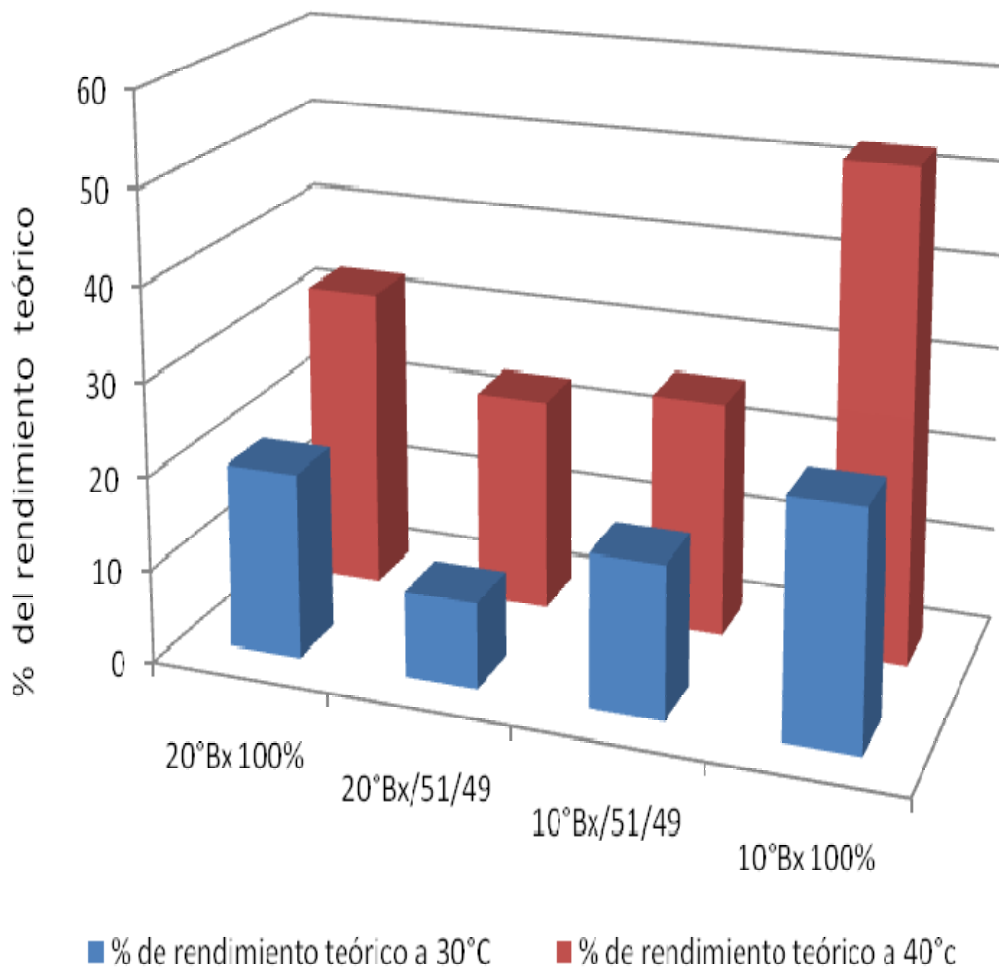


Figura 20. Muestra el porcentaje del rendimiento que en teoría debió obtenerse en la producción de etanol por *Kluveromyces marxianus* en mostos de *Agave tequilana* Weber a temperaturas de 30 °C y 40 °C. Los datos de rendimiento se obtuvieron a partir de los cálculos mostrados en el apéndice 1.

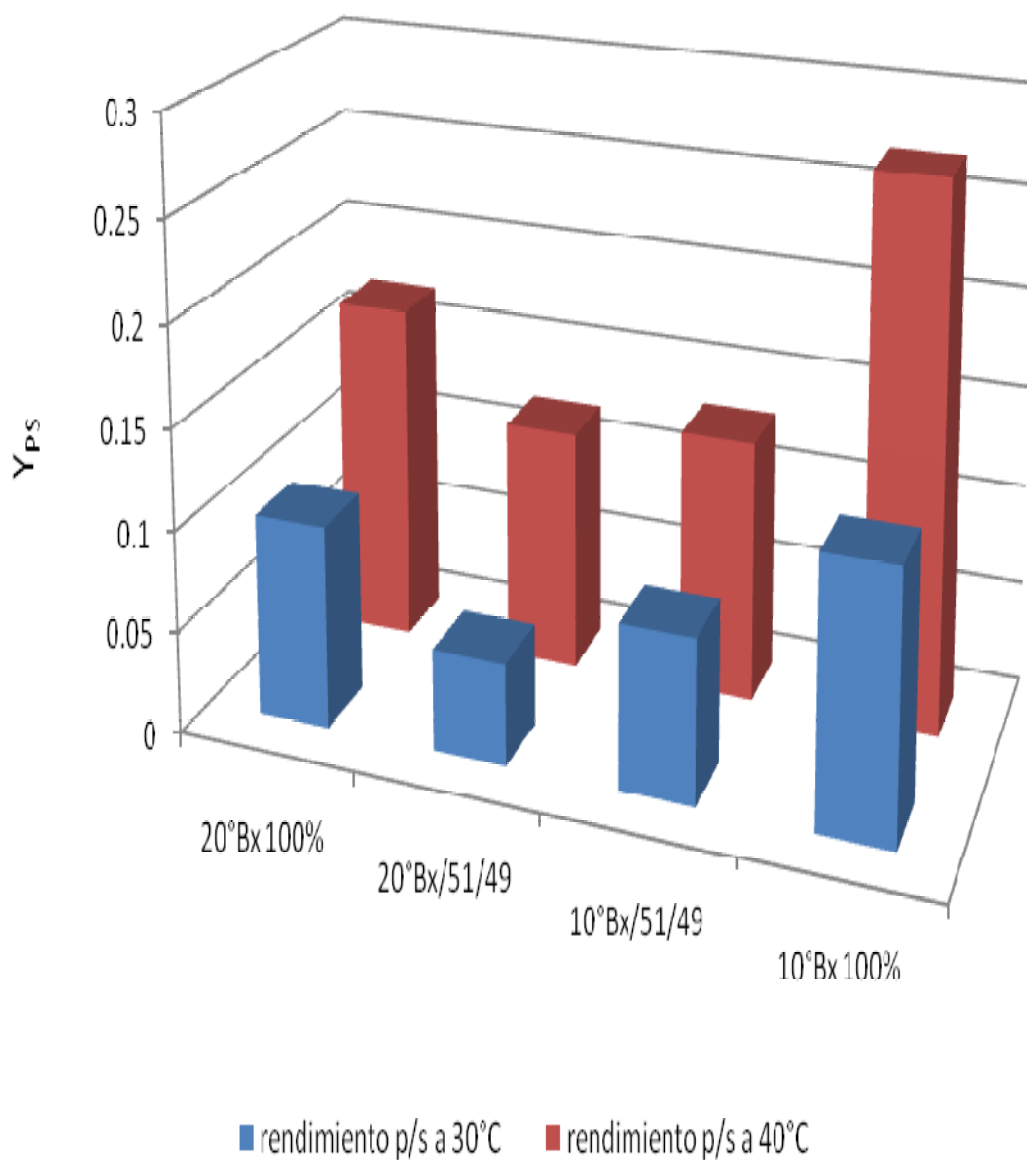


Figura 21. Muestra el rendimiento real de la producción de etanol en g de etanol producido/g de azúcares consumidos por *Kluyveromyces marxianus* en mostos de *Agave tequilana* Weber a 30 °C y 40 °C, Los datos del gráfico se obtuvieron a partir de los cálculos mostrados en el apéndice 1.

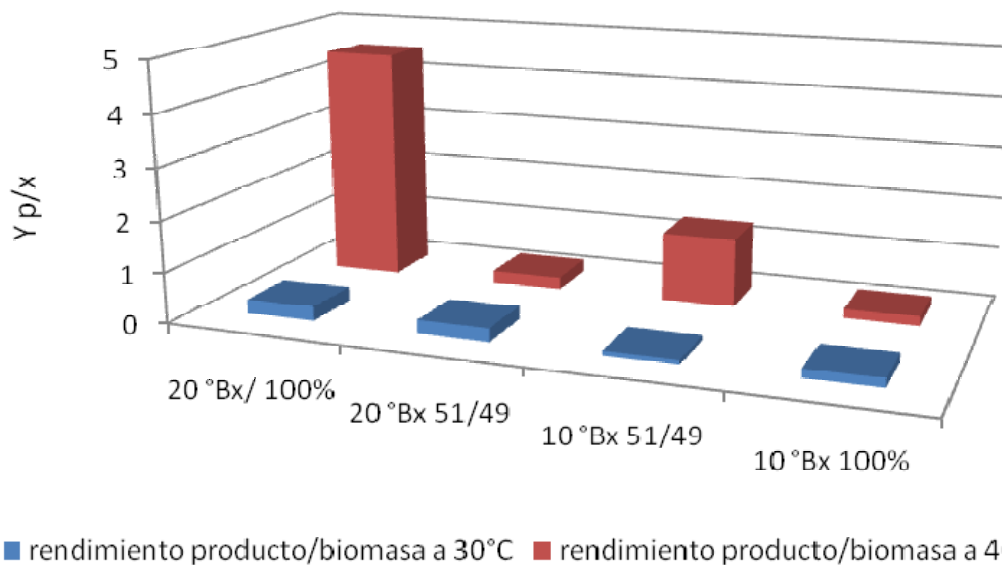


Figura 22. Muestra el rendimiento de la producción de etanol por la cantidad de biomasa de *Kluveromyces marxianus* producida durante la fermentación a 30 y 40 °C en mostos de *Agave tequilana* Weber. Cálculos en apéndice 1.

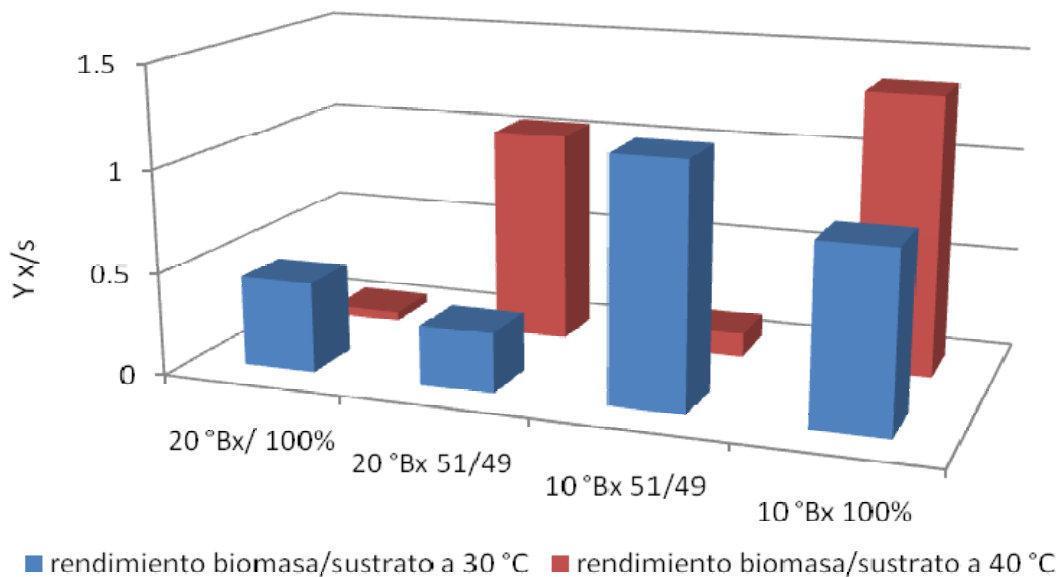


Figura 23. Muestra el rendimiento de la producción de biomasa de *Kluveromyces marxianus* en gramos de biomasa/ gramos de sustrato consumido durante la fermentación a 30 y 40°C en mostos de *Agave tequilana* Weber. Cálculos en apéndice 1.

Determinación de etanol, metanol, acetato de etilo y alcohol isoamílico por cromatografía de gases

Durante la fermentación alcohólica las levaduras producen además de etanol y CO₂ algunos otros compuestos que imparten sabor y aroma y que además contribuyen de gran manera a las características distintivas del tequila, algunos de éstos, son los alcoholes superiores como el alcohol isoamílico, los aldehídos como el acetaldehído y los ésteres como el acetato de etilo; sin embargo, también se producen algunos otros compuestos que son indeseables por su toxicidad, tal es el caso del metanol y debido a ello, la NOM-006-SCFI-2005 menciona la concentración permitida de algunos de estos compuestos. Cabe hacer mención que los datos expuestos en la NOM se encuentran reportados en mg/100mL de alcohol anhidro; sin embargo, para fines comparativos se hizo la conversión de estos datos a concentraciones porcentuales (cálculos apéndice 2) debido a que el método con que se llevó a cabo la destilación, no permite obtener alcohol anhidro; lo anterior debido a que los puntos de ebullición de los componentes de una mezcla sólo difieren ligeramente, no se puede conseguir la separación total en una destilación individual, en este caso la separación de agua, que posee un punto de ebullición a 100 °C, y alcohol, que tiene un punto de ebullición a 78,5 °C. Al poner en ebullición una mezcla de estos dos líquidos, el vapor que sale es más rico en alcohol y más pobre en agua que el líquido del que procede, pero no es alcohol puro. Con el fin de concentrar una disolución que contenga un 10% de alcohol (como la que puede obtenerse por fermentación) para obtener una disolución que contenga un 50% de alcohol, el destilado ha

de destilarse una o dos veces más, y si se desea alcohol industrial (95%) son necesarias varias destilaciones. Es por ello que en este caso se empleó para análisis un destilado con una concentración de 35% de etanol (v/v).

De acuerdo con los datos mostrados en las figuras 24 y 25, se observa claramente que *Kluyveromyces marxianus* tiene la capacidad de producir acetato de etilo, metanol y alcohol isoamílico en concentraciones muy elevadas. Haciendo la comparación con los datos reportados en la norma, se tiene que estos compuestos se encuentran en proporciones 100 veces mayores en las muestras de las diferentes fermentaciones llevadas a cabo, pues se reporta como valor máximo de acetato de etilo $7.76 \cdot 10^{-4}$ %, de alcohol isoamílico 0.0021% y de metanol $1.32 \cdot 10^{-3}$; esto podría deberse a que las muestras se destilaron únicamente una vez, por lo que se obtuvo el llamado “ordinario” el cual debería ser rectificado para eliminar el excedente de metanol y bajar las concentraciones de los otros compuestos producidos por *Kluyveromyces marxianus*. Otro compuesto que se reporta en la norma, es el acetaldehído, que está permitido en concentraciones de 0 a 4 mg/mL de alcohol anhidro; este dato no fue añadido a la gráfica puesto que no se detectó este compuesto en ninguno de los destilados. Sin embargo, se encuentra dentro del valor de la norma ya que es permitido que no exista acetaldehído en el destilado.

A pesar de haber obtenido valores de estos compuestos en concentraciones muy elevadas se puede concluir de estos resultados que *Kluyveromyces marxianus* tiene la capacidad de producir además del etanol, otros compuestos que son necesarios para el aroma y el sabor característicos del tequila como los son, el alcohol isoamílico y el acetato de etilo.

De acuerdo con las figuras 24 y 25 se puede ver que para obtener una mayor concentración de congenéricos se debe llevar a cabo la fermentación en un mosto 51% agave /49% sacarosa, a una concentración de 10°Bx y una temperatura de 30°C; sin embargo, es importante notar que a estas condiciones hay una concentración muy elevada de metanol, por lo que es recomendable destilar nuevamente para eliminar este compuesto tóxico.

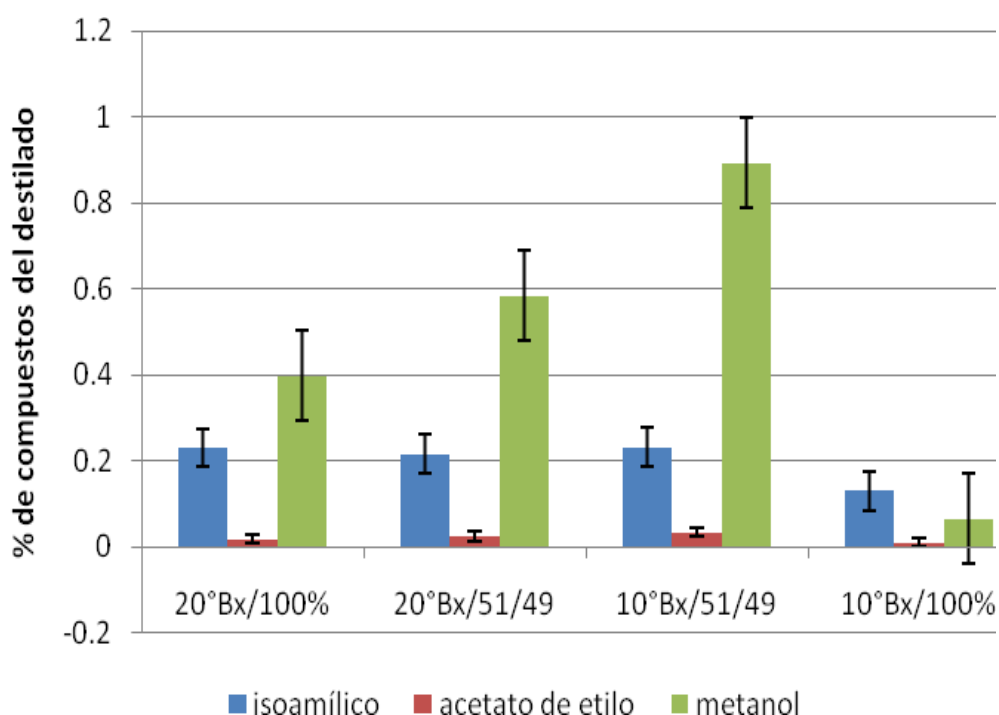


Figura 24. Muestra la cantidad de compuestos congenéricos detectados en los destilados de la fermentación a 30 °C por cromatografía de gases en un Cromatógrafo GC 6890 Agilent technologies con un detector FID y una columna INOWAX usando una rampa de temperaturas de 40 °C durante 1 min, 150 °C 3 min y 17 minutos a 200 °C. No se muestra el etanol porque para todos los casos éste se ajustó a 35% v/v.

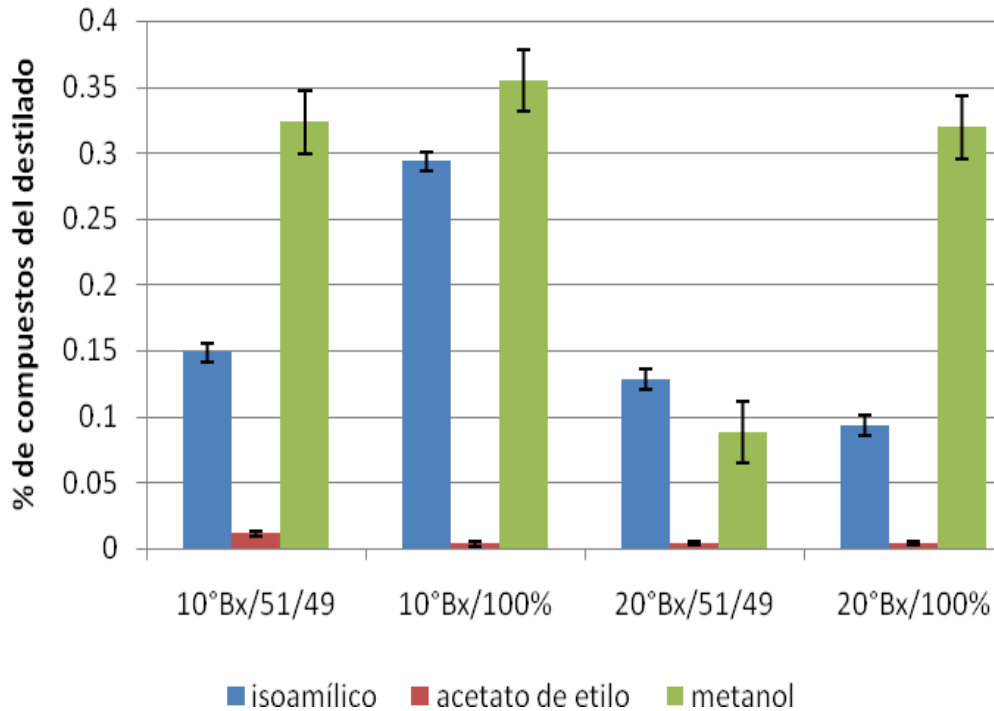


Figura 25. Muestra la cantidad de compuestos congénicos detectados en los destilados de la fermentación a 40 °C por cromatografía de gases en un Cromatógrafo GC 6890 Agilent technologies con un detector FID y una columna INOWAX usando una rampa de temperaturas de 40 °C durante 1 min, 150 °C 3 min y 17 minutos a 200°C. No se muestra el etanol porque para todos los casos éste se ajustó a 35% v/v.

Evaluación de la tolerancia a etanol de *K. marxianus*.

En la figura 26 se observa que con 5%, 6% y 7% de etanol (v/v) en el medio YPD, hubo crecimiento de microorganismos ya que como se muestra en el mismo gráfico, la cantidad inicial de microorganismos (barra azul) es menor a la cantidad de levaduras contadas después de ser incubadas durante 48 horas (barra roja), y al ir aumentando la concentración de etanol en el medio, la cantidad de células va disminuyendo hasta que a 12% de etanol, ya no hay células viables en el medio. Lo anterior es debido a que el etanol es tóxico

para el metabolismo de las levaduras y al estar presente en concentraciones mayores a 7% provoca la pérdida de viabilidad celular y la inhibición del crecimiento celular sobre *Kluyveromyces marxianus*.

De la figura 26 se puede concluir que *Kluyveromyces marxianus* es apta para formar parte de una fermentación de este tipo, porque durante la producción del tequila, se llegan a obtener concentraciones de etanol hasta del 6%, y en este ensayo se observó que en medios con 5%, 6 % y 7% de etanol, *Kluyveromyces marxianus* tiene la capacidad de vivir y reproducirse.

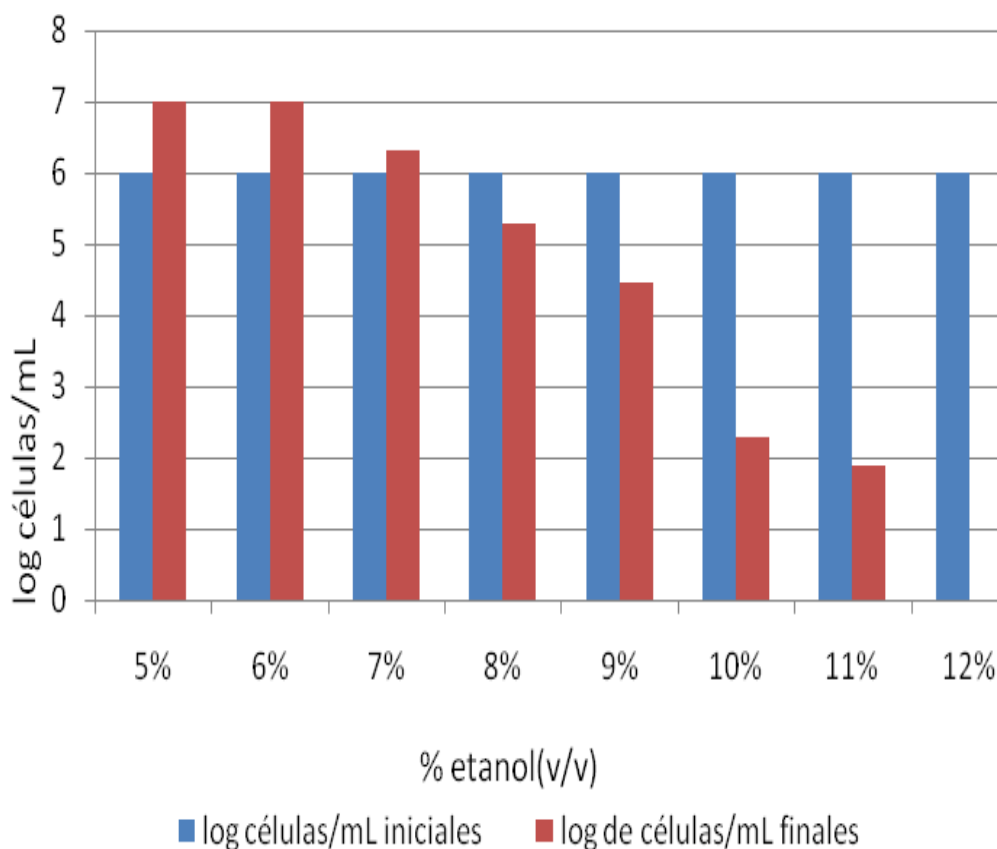


Figura 26. Indica la cantidad de microorganismos que crecieron en un medio YPD adicionado de etanol con concentraciones de 5% de etanol hasta 12% de etanol (v/v) después de 48 horas de incubación.

7. CONCLUSIONES

- El tiempo óptimo en el que se hidrolizan los fructanos del agave a una temperatura de 80 °C adicionado de 0.01% de H₂SO₄, es de 10 horas.
- Se observó que la condición ideal para que *Kluyveromyces marxianus* produzca etanol con mejores rendimientos es usando mostos 100% agave con una concentración de azúcares de 20°Bx y llevando a cabo la fermentación a 40 °C dado que bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 32.66%, una producción de 0.17g de etanol/ g de azúcar y un rendimiento sustrato/ biomasa de 3.6723g de etanol/g de biomasa.
- *Kluyveromyces marxianus* produjo a partir de mostos de agave a 10 y 20 °Bx y 30 °C y 40 °C entre 1.0% y 3.2% de etanol, obteniéndose mayor porcentaje de etanol en los mostos fermentados a 40 °C.
- *Kluyveromyces marxianus* toleró en cultivos en placa concentraciones de hasta 11% de etanol (v/v) viéndose afectado su crecimiento en concentraciones mayores a 7% de etanol (v/v).
- *Kluyveromyces marxianus* consume preferentemente monosacáridos.
- *Kluyveromyces marxianus* tiene la capacidad de producir compuestos de aroma bajo las condiciones de fermentación estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- **A.H. Rose.** “History and scientific basis of alcoholic beverages production”, Alcoholic beverages, A.H. Rose (comp.), Academic Press, London, 1997, pp.1-41
- **Anderson. PJ,** McNeil K, Watson K, (1986).”High-Efficiency Carbohydrate Fermentation to Ethanol at temperatures above 40° C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* Isolated from Sugar Mills”. ***Applied and Environmental Microbiology.*** 1314 – 1320.
- **Astromoff A.** “Saccharomyces cerevisiae: Genetics and Genomics, In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology”, Demian Arnold L, 2nd edition, USA 2000, ASM press, pp 435 – 446
- **B.O. Yépez Silva-Santiesteban y Maugeri. F.** (2005). “Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*”. ***Enzyme and Microbial technology.*** **36:** 717 – 724.
- **Bajpai. P y Margaritis. A.** (1982). “Ethanol Inhibition Kinetics of *Kluyveromyces marxianus* Grown on Jerusalem Artichoke Juice. ***Applied and Environmental Microbiology.*** 1325-1329.
- **Ballesteros. M,** Oliva. J.M, Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004). “Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875”. ***Process Biochemistry.*** **39:** 1843-1848.

-
-
- **Banat, IM**, Nigam P, Marchant R (1992). « Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C”. *World Journal microbiology Biotechnology* **8**: 259-263.
 - **Barnett. JA**, Payne RW, and Yarrow. D ”Yeasts: Characteristics and identification”, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1990, pp.47,66,67,420 – 421.
 - **Benn S.** and Peppard L.T., (1996)“Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis”, *J Agric Food Chem* **44**, pp. 557–566.
 - **Cáceres-Farfán M**, Lappe P, Larqué-Saavedra A, Magdub-Méndez A and Barahona-Pérez L, (2008) “Ethanol production from henequen (Agave fourcroydes Lem.)”, *Bioresour. Technol*, (2008)
 - **Carrasco. P**, Querol. A, del Olmo M., (2001).”Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains”. *Arch Microbiol.* **175**:450 – 457.
 - **Cedeño. C** y Álvarez. J, Production of tequila from agave. Tequila Herradura, México. 1995. <http://www.scocia.com/newsite/tequila.pdf>.
 - **Collado Quique.** “Levaduras y fermentación alcohólica”. Dossier, ACE revista de enología, CONABIO- SIRE <http://148.225.52.2/tax01302htm>
 - **Esteve – Zarzoso. B**, Manzanares P, Ramón D, and Querol A., (1993). “The role of non Saccharomyces yeasts in industrial winemaking”. *International Microbiology.* **1**
 - **Fonseca. G.** Gombert. A, Heinzle. E. and Wittmann. C., (2007). “Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch

chemostat cultures with glucose as the sole carbon source". **FEMS Yeast Res 7**: 422 – 435.

- **Fonseca. G.**, Heinzle. E., Wittman. C y Gombert. A., (2008). "The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential." **Appl Microbiol Biotechnol 79**: 339-354.
- **García Mendoza A.**, 1998. "Con sabor a maguey". Guía de Colección Nacional de agaváceas y nolináceas del jardín botánico, del instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F, pp 4, 9, 23, 31 – 32, 35.
- **García. G, et al.**, "BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA". Bebidas alcohólicas no destiladas. Limusa 1ª edición, México,1993,pp.263-266
- **Guzmán J.**, "Extracción de inulina a partir de piñas de agave mezcalero, *Agave angustifolia*. Haw". Tesis Maestría, UNAM, México DF. 2006
- **Incitti. S**, et al., (1980), "Determination of minor volatiles constituents of spirits". **Riv.Soc. Ital. Scien. Aliment.,9** (1), 43- 50
- **Ingram LO**, Buttke. (1984)."Effects of alcohols on microorganisms". **Adv. Microb. Physiol. 25**: 253 – 300.
- **Juárez R.**, "Determinación De Terpenos En Tequila 100% Agave". Tesis, UNAM, México DF. 2006
- **Kida. K, et al.**, (1992). "Repeated- batch fermentation process using a thermotolerant flocculating yeast constructed by protoplast fusion". **Journal of fermentation biotechnology. 74**: 169 – 173.
- **King. A**, y Dickinson, J. (2000) "Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*". **Yeast. 16**: pp 499-506

-
-
- **Lachance. M.** (1995) “Yeast communities in a natural tequila fermentation”. ***Antonie van Leeuwenhoek***.**68**: 151-160.
 - **Leao. C,** van Uden. N. (1982). “Effect of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*”. ***Biotech Bioeng.*** **24**: 2601 – 2604.
 - **Leao. C,** van Uden. N. (1984). “Effect of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. ***Biochim Biophys. Acta*** **774**: 43 – 48.
 - **Lei.J,** Zhao. X, Ge. X, Bai. F (2007) “Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution”. ***Journal of Biotechnology,*** **131,** Issue 3, 15 September 2007,270-275
 - **Limntong. S.,** Sringiew .C. and Yongmanitchai. W., (2007).”Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*”. ***Bioresource Technology.*** 3367 – 3374.
 - **Manjarrez. A** y M. Llama, (1969), “Cuantificación de los componentes volátiles en tequilas y mezcales por cromatografía en fase de vapor”, ***Rev. Soc. Quim. México.***,enero, 1 A-5 A
 - **Margaritis. A.** y Bajpai. P. (1982). “Direct Fermentation of D- Xylose to Ethanol by *Kluyveromyces marxianus* Strains”. ***Applied and Environmental Microbiology.*** **44**:1039 – 1041.
 - **Margaritis. A.** y Bajpai. P. (1983). “Effect of Sugar Concentration in Jerusalem Artichoke Extract on *Kluyveromyces marxianus* Growth and

Ethanol Production”. ***Applied and Environmental Microbiology***.**45**:723 – 725.

- **Nabais. R.** Sa-Correia. I, Viegas. C and Novais. J., (1998).”Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts”. ***Applied and Environmental Microbiology***. 2439 – 2446.
- **Noriega A.**, “Comparación de la diversidad de levaduras en una fermentación natural y una inoculada en mostos de agave 100% para la producción de tequila”. Tesis Maestría, UNAM, México DF. 2007
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, bebidas alcohólicas- Tequila- especificaciones.
- **Ortiz Q.F.** (2003). “Tequila deidades y presagios”. La compañía de los libros. Ed. Tequila. Pp 15-20.
- **Patel. S,** Shibamoto. T. (2003). “Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine”. ***Journal of food composition and Analysis***. **16**:469 – 476.
- **Praznik, W,** Cieslik, E, and López MG (2002), “Composition of nutritional components in *Agave tequilana* Weber var. azul.9th Seminar on Inulin”, April 2002, Budapest, Hungary.
- **Ramírez-Gamma. R,** Luna. B, Mejía. A, Velázquez. O., Tsuzuki. G, Vierna. L., Hernández. L. y Muggenburg. I., ”Manual de prácticas de microbiología general”, Facultad de Química UNAM,1996, p.p 141-143
- **Ricca. E,** Calabró. V, Curcio. S y Iorio. G. (2007). “The state of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis”. ***Critical Reviews in Biotechnology***. **27**:3 129 – 145.

-
-
- **Rowenhorst. J.** Visser LE, van der Baan AA, Scheffers WA, van Dijken JP., (1998). "Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556". ***Applied and Environmental Microbiology***.1131 -1137.
 - **Salgueiro. S.** Sa-Correia. I. and Novais. J, (1988). "Ethanol-Induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity". ***Applied and Environmental Microbiology***. 903 – 909.
 - **Sánchez-Marroquín, A.** y P.H. Hope. (1953). "Fermentation and chemical composition studies of some species". ***Agric. Food Chem.*** **246:1**
 - **Santillán C.**, "Caracterización del tequila por cromatografía de gases". Tesis Maestría, UNAM, México DF.1998
 - **Sree K.,** Sridhar. M., Vengateswar Rao. L., Pnadey A. (1999). "Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast." ***Process Biochemistry*** **34:115-119**.
 - **Viegas C.A.,** Rosa M.F., Sá-Correia I., Novais J.M. (1989). " Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation". ***Appl Environ Microbiol*** **55: 21-28**.
 - **Waleckx. E,** Gschaedler. A, Colonna-Ceccaldi. B, Monsan. P (2008), "Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process", ***Food Chemistry*** **108: 40 – 48**.
 - **Walker. G.,** "Yeast physiology and biotechnology", John Wiley & Sons, 1998, pp. 216-217.

-
-
- **Wittman. C.**, Hans. M and Bluemke. W., (2002). “Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*”. **Yeast**. **19**: 1351 – 1363.
 - **Zafar Salman**, Owais Mohammad, (2006) “Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*”, **Biochemical Engineering Journal** **27**: 295-298.

ANEXOS

Anexo1. Curvas patrón empleadas para la determinación de etanol, fructosa, glucosa, inulina y sacarosa vía HPLC

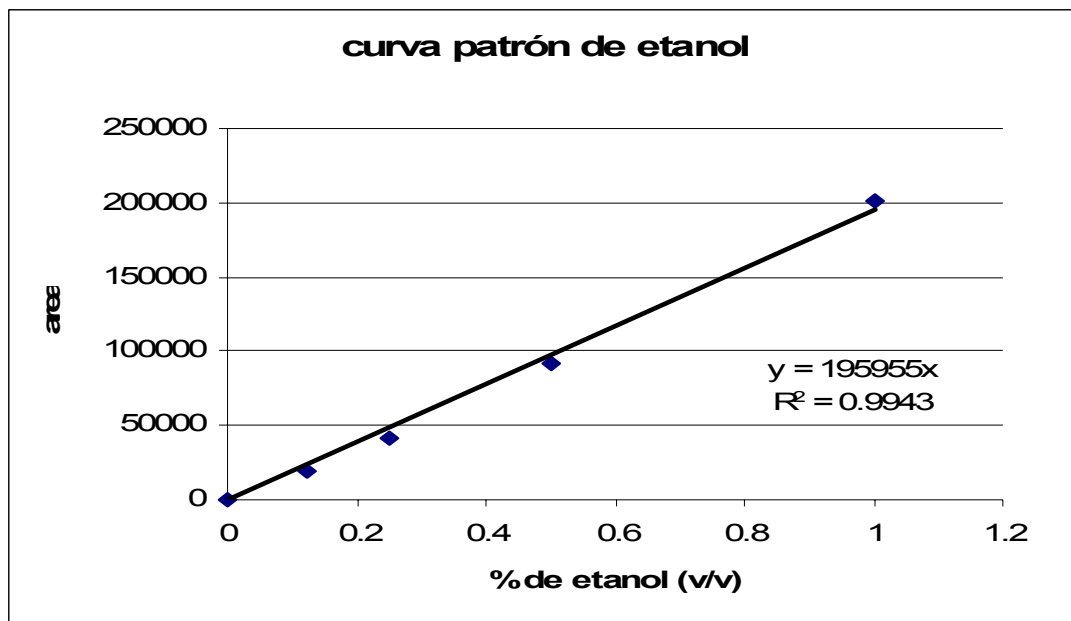


Gráfico 1a. Muestra las concentraciones porcentuales de etanol vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta del mismo.

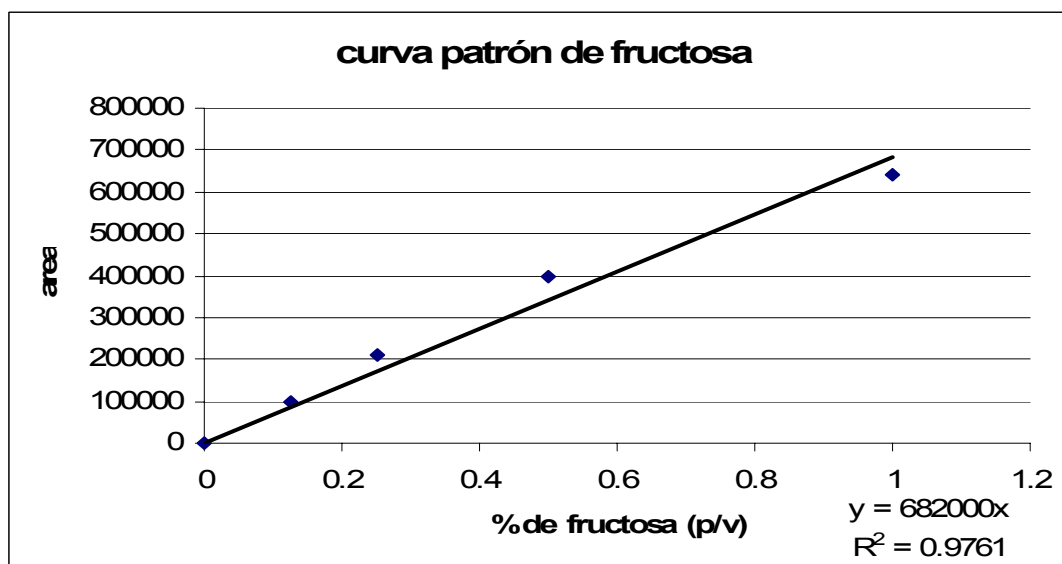


Gráfico 2a. Muestra las concentraciones porcentuales de fructosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta de la misma.

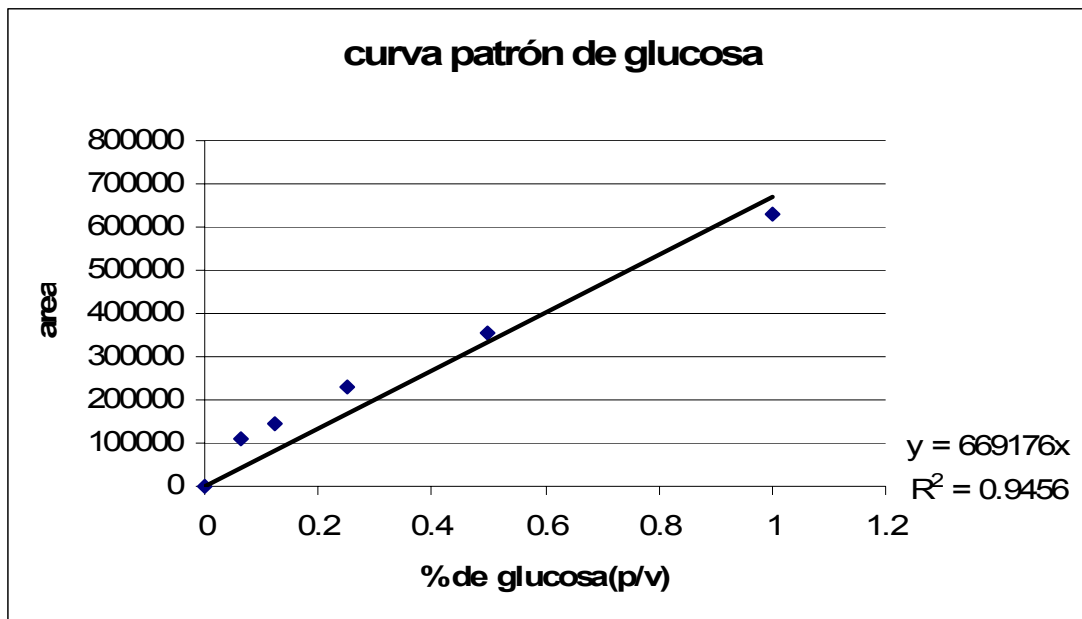


Gráfico 3a. Muestra las concentraciones porcentuales de glucosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta de la misma.

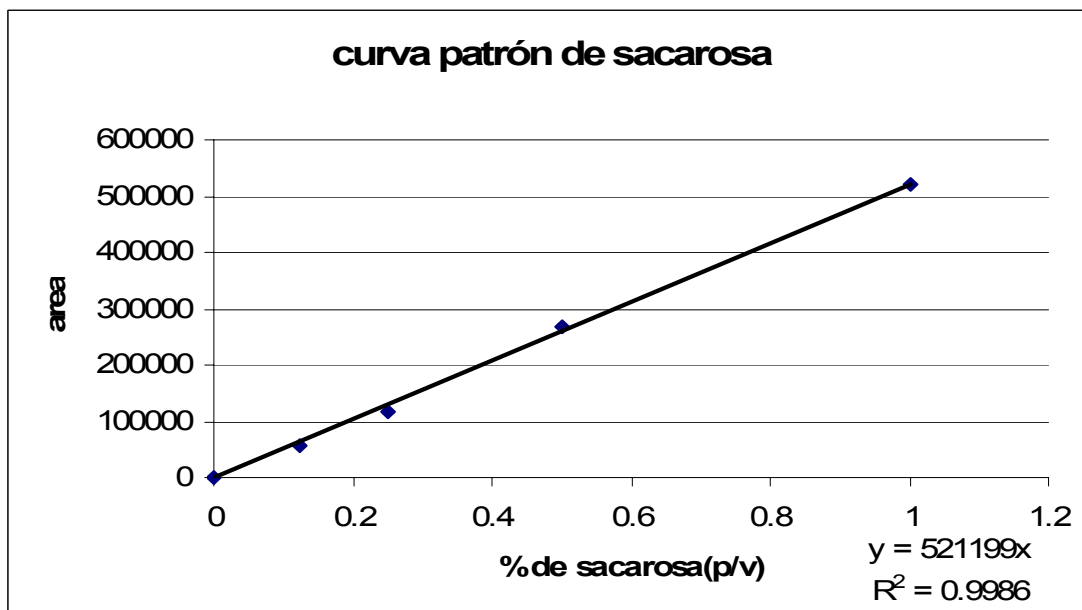


Gráfico 4a. Muestra las concentraciones porcentuales de sacarosa vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta de la misma.

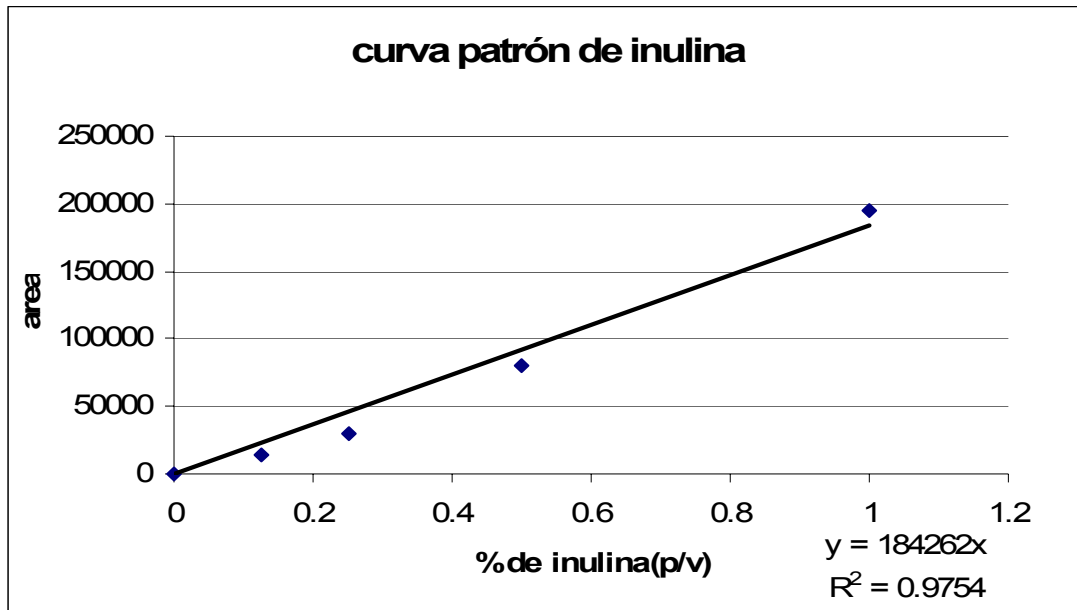


Gráfico 5a. Muestra las concentraciones porcentuales de inulina vs área del pico de un cromatograma HPLC y la ecuación de la recta de la misma.

Anexo 2

Curvas patrón utilizadas para la determinación de etanol, metanol, alcohol isoamílico y acetato de etilo por cromatografía de gases

Curva patrón acetato de etilo

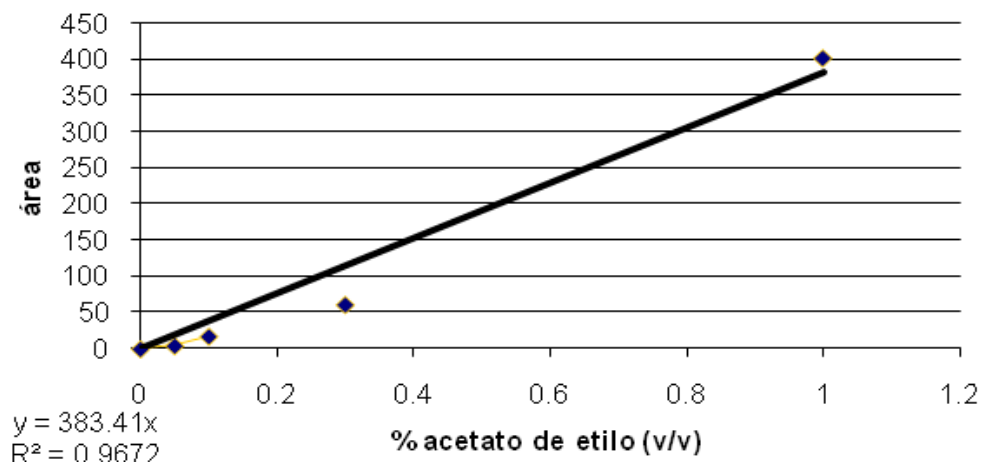


Gráfico 6a. Muestra las concentraciones porcentuales de acetato de etilo vs área del pico de un cromatograma generado por cromatografía de gases y la ecuación de la recta de la gráfica.

curva patrón de etanol

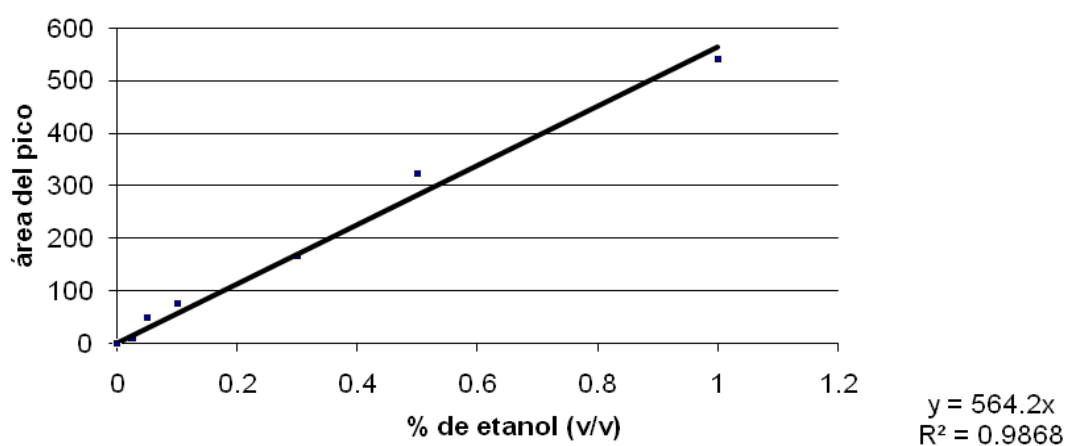


Gráfico 7a. Muestra las concentraciones porcentuales de etanol vs área del pico de un cromatograma generado por cromatografía de gases y la ecuación de la recta de la gráfica.

Curva patrón alcohol isoamílico

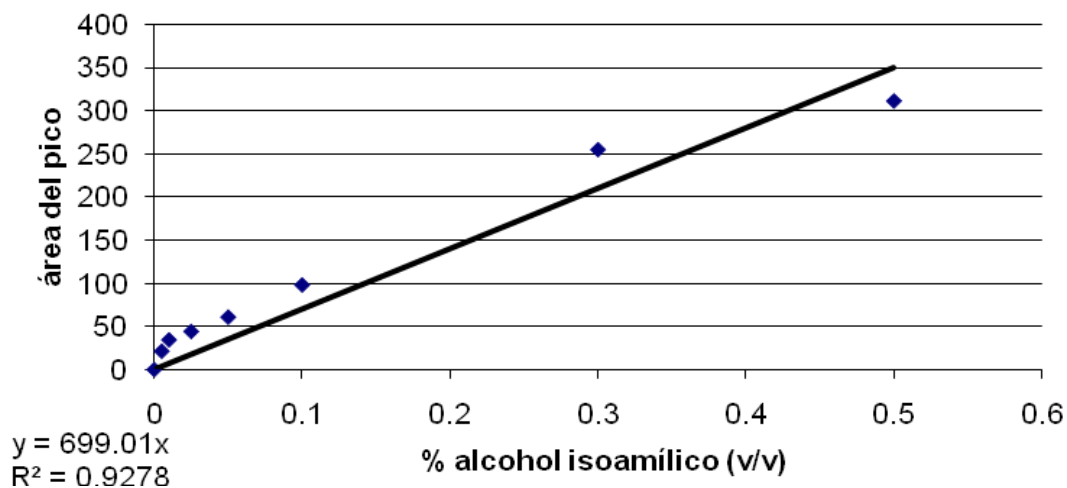


Gráfico 8a. Muestra las concentraciones porcentuales de alcohol isoamílico vs área del pico de un cromatograma generado por cromatografía de gases y la ecuación de la recta de la gráfica.

Curva patrón de metanol

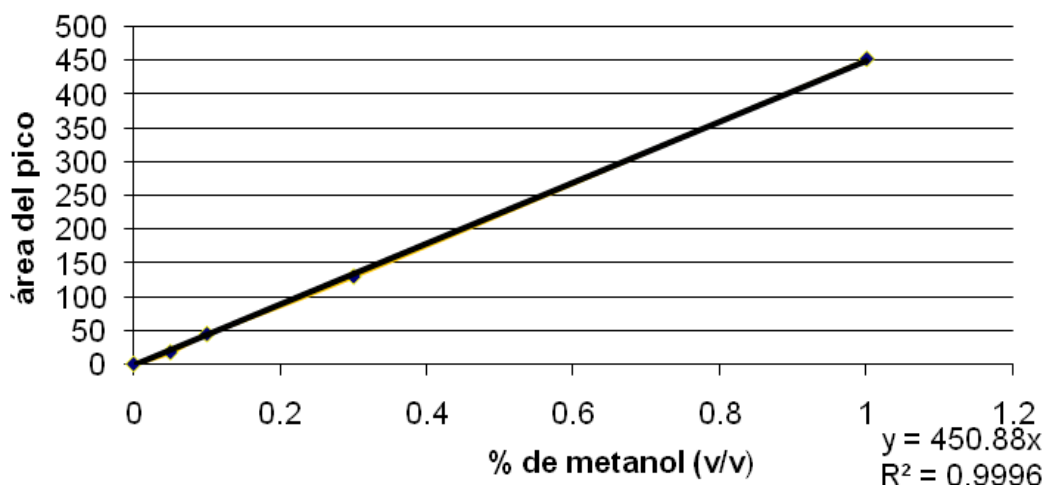


Gráfico 9a. Muestra las concentraciones porcentuales de metanol vs área del pico de un cromatograma generado por cromatografía de gases y la ecuación de la recta de la gráfica.

APENDICE 1

Cálculo de rendimiento teórico para cada fermentación



$$\text{PM C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 = 180\text{g/mol}$$

$$\text{PM CH}_3\text{CH}_2\text{OH} = 46\text{g/mol}$$

$$\rho \text{ CH}_3\text{CH}_2\text{OH} = 0.81\text{g/mL}$$

Los números de las fermentaciones hacen referencia a las siguientes condiciones de fermentación:

	Condiciones de fermentación
1	Mosto 100% agave, 20 °Bx, 30 °C.
2	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 20 °Bx, 30 °C.
3	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 10 °Bx, 30 °C.
4	Mosto 100% agave, 10 °Bx, 30°C.
5	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 10 °Bx, 40 °C.
6	Mosto 100% agave, 10 °Bx, 40 °C.
7	Mosto 51% agave 49% sacarosa, 20 °Bx, 40 °C.
8	Mosto 100% agave, 20 °Bx, 40 °C.

$$1. 15.8522\text{g}_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180\text{g}_{\text{fructosa}}) * 2(46\text{g/mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 10\text{mL}$$

etanol

$$(1.9922\text{mL reales} * 100 / 10\text{mL teóricos}) = \mathbf{19.92 \%}$$

$$2. 17.2786\text{g}_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180\text{g}_{\text{fructosa}}) * 2(46\text{g/mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 10.9\text{mL}$$

$$(1\text{mL real} * 100/ 10.9\text{mL teóricos}) = \mathbf{9.17\%}$$

$$3. 10.20g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 6.43\text{mL}$$

$$(1.0484 \text{ mL reales} * 100/ 6.43\text{mL teóricos}) = \mathbf{16.30\%}$$

$$4. 8.1021g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 5.11\text{mL}$$

$$(1.2826 \text{ mL reales} * 100/ 5.11\text{mL teóricos}) = \mathbf{25.10\%}$$

$$5. 9.4328g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 5.95\text{mL}$$

$$(1.5124 \text{ mL reales} * 100/ 5.95\text{mL teóricos}) = \mathbf{25.42\%}$$

$$6. 8.1184g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 5.12\text{mL}$$

$$(2.6839\text{mL reales} * 100/ 5.12\text{mL teóricos}) = \mathbf{52.42\%}$$

$$7. 16.308g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 10.29\text{mL}$$

$$(2.3752 \text{ mL reales} * 100/ 10.29 \text{ mL teóricos}) = \mathbf{23.10\%}$$

$$8. 15.70g_{\text{fructosa}} * (1\text{mol}_{\text{fructosa}}/180g_{\text{fructosa}}) * 2(46g/\text{mol}) * 1/\rho_{\text{etanol}} = 9.906\text{mL}$$

$$(3.2354 \text{ mL reales} * 100/ 9.906\text{mL teóricos}) = \mathbf{32.66\%}$$

Cálculo de rendimiento producto/sustrato

$Y_{P/S}$ gramos de producto / gramos de sustrato.

$$1. (1.9922\text{mL}_{\text{etanol}} * 0.81\text{g/mL})/ 15.8522\text{g}_{\text{azúcar}} = \mathbf{0.10\text{g de etanol/g de azúcar}}$$

$$2. (1\text{mL}_{\text{etanol}} * 0.81\text{g/mL})/ 17.2786\text{g}_{\text{azúcar}} = \mathbf{0.05\text{g de etanol/g de azúcar}}$$

$$3. (1.0484\text{mL}_{\text{etanol}} * 0.81\text{g/mL})/ 10.20\text{g}_{\text{azúcar}} = \mathbf{0.08\text{g de etanol/g de azúcar}}$$

$$4. (1.2826\text{mL}_{\text{etanol}} * 0.81\text{g/mL})/ 8.1021\text{g}_{\text{azúcar}} = \mathbf{0.13\text{g de etanol/g de azúcar}}$$

$$5. (1.5124\text{mL}_{\text{etanol}} * 0.81\text{g/mL})/ 9.4328\text{g}_{\text{azúcar}} = \mathbf{0.13\text{g de etanol/g de azúcar}}$$

6. $(2.6839\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 8.1184\text{g}_{\text{ azúcar}} = 0.27\text{g de etanol/g de azúcar}$

7. $(2.3752\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 16.3088\text{g}_{\text{ azúcar}} = 0.12\text{g de etanol/g de azúcar}$

8. $(3.2354\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 15.70\text{g}_{\text{ azúcar}} = 0.17\text{g de etanol/g de azúcar}$

Cálculo de rendimiento producto/biomasa

1. $((1.9922\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) /) / 7\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.2305\text{g de etanol/g de biomasa}$

2. $(1\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 5\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.2065\text{g de etanol/g de biomasa}$

3. $(1.0484\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 12\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.07076\text{g de etanol/g de biomasa}$

4. $(1.2826\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 7\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.148415\text{g de etanol/g de biomasa}$

5. $(1.5124\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 1.1\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.1010109\text{g de etanol/g de biomasa}$

6. $(2.6839\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 11\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.197632\text{g de etanol/g de biomasa}$

7. $(2.3752\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 17\text{g}_{\text{ biomasa}} = 0.113171\text{g de etanol/g de biomasa}$

8. $(3.2354\text{mL}_{\text{ etanol}} * 0.81\text{g/mL}) / 0.7\text{g}_{\text{ biomasa}} = 3.6723\text{g de etanol/g de biomasa}$

Cálculo de rendimiento biomasa/sustrato

1. $(7\text{g}_{\text{biomasa}} / 15.8522\text{g}_{\text{azúcar}}) = 0.441579\text{g de biomasa/g de azúcar}$
2. $(5\text{g}_{\text{biomasa}} / 17.2786\text{g}_{\text{azúcar}}) = 0.28937\text{g de biomasa/g de azúcar}$
3. $(12\text{g}_{\text{biomasa}} / 10.20\text{g}_{\text{azúcar}}) = 1.17577\text{g de biomasa/g de azúcar}$
4. $(7\text{g}_{\text{biomasa}} / 8.1021\text{g}_{\text{azúcar}}) = 0.863973\text{g de biomasa/g de azúcar}$
5. $(1.1\text{g}_{\text{biomasa}} / 9.4328\text{g}_{\text{azúcar}}) = 0.116608\text{g de biomasa/g de azúcar}$
6. $(11\text{g}_{\text{biomasa}} / 8.1184\text{g}_{\text{azúcar}}) = 1.354936\text{g de biomasa/g de azúcar}$
7. $(17\text{g}_{\text{biomasa}} / 16.3088\text{g}_{\text{azúcar}}) = 1.04238\text{g de biomasa/g de azúcar}$
8. $(0.7\text{g}_{\text{biomasa}} / 15.70\text{g}_{\text{azúcar}}) = 0.04458\text{g de biomasa/g de azúcar}$

APENDICE 2

Conversión de datos de la NOM-006-SCFI-2005

$$\rho_{\text{metanol}} = 0.7918 \text{ g/mL}$$

$$\rho_{\text{acetato de etilo}} = 0.902 \text{ g/mL}$$

$$\rho_{\text{alcohol isoamílico}} = 0.81 \text{ g/mL}$$

Valor mínimo de metanol

$$(30\text{mg}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{etOH}}) * (35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}}) * (1\text{g}_{\text{metOH}}/1000\text{mg}_{\text{metOH}})/$$

$$\rho_{\text{metOH}} = 1.32 * 10^{-4} \%$$

Valor máximo de metanol

$$(300\text{mg}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{etOH}}) * (35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}}) * (1\text{g}_{\text{metOH}}/1000\text{mg}_{\text{metOH}})/$$

$$\rho_{\text{metOH}} = 1.32 * 10^{-3} \%$$

Valor mínimo de acetato de etilo

$$(2\text{mg}_{\text{AcOet}}/100\text{mL}_{\text{etOH}}) * (35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}}) * (1\text{g}_{\text{AcOet}}/1000\text{mg}_{\text{AcOet}})/$$

$$\rho_{\text{AcOet}} = 7.76 * 10^{-6} \%$$

Valor máximo de acetato de etilo

$$(200\text{mg}_{\text{AcOet}}/100\text{mL}_{\text{etOH}})*(35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}})*(1\text{g}_{\text{AcOet}}/1000\text{mg}_{\text{AcOet}})/$$

$$\rho_{\text{AcOet}} = 7.76 * 10^{-4} \%$$

Valor mínimo de alcohol isoamílico

$$(20\text{mg}_{\text{isoam}}/100\text{mL}_{\text{etOH}})*(35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}})*(1\text{g}_{\text{isoam}}/1000\text{mg}_{\text{isoam}})/$$

$$\rho_{\text{isoam}} = 8.64 * 10^{-5} \%$$

Valor máximo de alcohol isoamílico

$$(500\text{mg}_{\text{isoam}}/100\text{mL}_{\text{etOH}})*(35\text{mL}_{\text{metOH}}/100\text{mL}_{\text{tequila}})*(1\text{g}_{\text{isoam}}/1000\text{mg}_{\text{isoam}})/$$

$$\rho_{\text{isoam}} = 0.0021 \%$$

APENDICE 3

Promedio y desviación estándar de los ensayos realizados

Fermentación 20 °Bx, 30 °C, 100 % Agave

TIEMPO	INULINA ± 0.10	SACAROSA ± 0.04	GLUCOSA ± 0.02	FRUCTOSA ± 0.47	ET OH ± 0.05	K. marx ± 0.27
0	2.34	1.97	2.06	11.82	0.076	5.46
6	2.24	1.68	0	11.85	0.27	5.61
9	2.12	1.63	0	11.32	0.43	5.54
12	2.60	1.96	0	12.54	0.65	6.48
24	2.10	1.64	0	6.28	1.45	7.26
36	2.27	1.74	0	6.78	1.77	8.85
48	1.83	1.41	0	6.09	1.99	8.85

Fermentación 20 °Bx, 30 °C, 51 % Agave, 49 % Sacarosa

TIEMPO	INULINA ± 0.08	SACAROSA ± 0.33	GLUCOSA ± 0.17	FRUCTOSA ± 0.08	ET OH ± 0.04	K. marx ± 0.08
0	1.22	9.26	1.79	6.23	0.057	5.57
6	1.02	9.47	1.11	6.53	0.30	5.28
9	1.19	8.68	0.97	6.08	0.42	6.46
12	1.12	7.88	0.00	6.04	0.54	6.43
24	1.14	8.47	0.00	5.57	1.08	7.18
36	1.10	8.56	0.00	4.80	1.20	8.15
48	1.18	9.00	0.71	3.61	1.27	8.70

Fermentación 10 °Bx, 30 °C, 51 % Agave, 49 % Sacarosa

TIEMPO	INULINA ± 0.02	SACAROSA ± 0.24	GLUCOSA ± 0.02	FRUCTOSA ± 0.08	ET OH ± 0.04	K. marx ± 0.04
0	0.69	5.61	0.98	3.61	0.06	5.57
6	0.63	5.26	0.69	3.17	0.23	5.70
9	0.60	4.95	0.59	2.92	0.33	6.57
12	0.67	5.34	0.56	2.98	0.43	6.38
24	0.63	5.26	0.47	2.33	0.71	7.08
36	0.58	4.61	0.36	1.82	0.80	8.90
48	0.58	4.93	0.38	1.51	1.05	9.08

Fermentación 10 °Bx, 30 °C, 100 % Agave

TIEMPO	INULINA ± 0.05	SACAROSA ± 0.03	GLUCOSA ± 0.04	FRUCTOSA ± 0.02	ET OH ± 0.03	K. marx ± 0.04
0	1.14	1.20	0.93	5.98	0.12	5.59
6	1.00	1.08	0.00	5.54	0.26	5.60
9	1.02	1.20	0.00	5.45	0.43	6.50
12	1.08	1.18	0.00	5.39	0.38	6.49
24	1.17	1.28	0.00	4.77	1.27	6.57
36	0.96	1.03	0.00	3.31	1.15	9.00
48	1.09	1.26	0.00	3.23	1.28	8.85

Fermentación 10 °Bx, 40 °C, 51 % Agave, 49 % Sacarosa

TIEMPO	INULINA ± 0.02	SACAROSA ± 0.12	GLUCOSA ± 0.03	FRUCTOSA ± 0.22	ET OH ± 0.03	K. marx ± 0.08
0	0.68	5.13	0.86	3.45	0.06	5.53
6	0.56	4.19	0.53	2.56	0.38	5.60
9	0.60	4.53	0.44	2.46	0.55	6.20
12	0.57	4.28	0.39	2.18	0.66	6.15
24	0.59	4.49	0.27	1.36	1.32	6.66
36	0.59	4.28	0.25	0.85	1.51	8.78
48	0.59	4.46	0.21	0.53	1.49	8.04

Fermentación 10 °Bx, 40 °C, 100 % Agave

TIEMPO	INULINA ± 0.05	SACAROSA ± 0.02	GLUCOSA ± 0.02	FRUCTOSA ± 0.08	ET OH ± 0.02	K. marx ± 0.04
0	1.16	1.22	0.91	6.00	0.11	5.34
6	1.32	1.30	0.00	6.30	0.54	5.34
9	1.02	1.17	0.00	4.84	0.69	6.23
12	1.01	1.12	0.00	4.31	0.87	6.20
24	0.95	1.06	0.00	2.51	1.27	6.97
36	1.04	1.18	0.00	1.41	2.16	9.08
48	1.04	0.46	0.00	0.75	2.68	9.04

Fermentación 20 °Bx, 40 °C, 51 % Agave, 49 % Sacarosa

TIEMPO	INULINA ± 0.06	SACAROSA ± 0.29	GLUCOSA ± 0.14	FRUCTOSA ± 0.13	ET OH ± 0.13	K. marx ± 0.04
0	1.07	8.95	1.48	5.88	0.09	5.57
6	1.07	8.80	0.97	5.56	0.39	5.36
9	1.01	8.01	0.73	4.66	0.67	6.04
12	0.94	7.53	0.00	4.70	0.79	6.23
24	0.93	7.57	0.51	2.77	1.48	7.18
36	1.08	9.24	0.00	1.96	2.74	9.18
48	0.89	7.39	0.36	0.90	2.37	9.23

Fermentación 20 °Bx, 40 °C, 100 % Agave

TIEMPO	INULINA ± 0.15	SACAROSA ± 0.03	GLUCOSA ± 0.02	FRUCTOSA ± 0.16	ET OH ± 0.21	K. marx ± 0.05
0	2.30	2.40	1.46	11.85	0.09	5.60
6	2.05	2.24	0.00	10.79	0.44	5.30
9	1.96	2.09	0.00	9.38	0.81	6.20
12	1.99	2.10	0.00	5.72	0.99	5.95
24	2.47	2.40	0.00	7.80	2.92	6.95
36	2.04	2.04	0.00	5.12	3.24	7.70
48	2.05	2.21	0.00	5.19	3.17	7.85

Promedio y desviación estándar de los destilados.

Determinación de Alcohol Isoamílico

Fermentaciones	Destilado 1	Destilado 2	Promedio	σ
20/30/100	0.2736	0.1880	0.2308	0.0605
20/30/51/49	0.1625	0.2701	0.2163	0.0761
10/30/51/49	0.1917	0.2737	0.2327	0.0580
10/30/100	0.0987	0.1619	0.1303	0.0447
10/40/51/49	0.1623	0.1361	0.1492	0.0190
10/40/100	0.1208	0.4676	0.2942	0.2453
20/40/51/49	0.1234	0.1342	0.1288	0.0076
20/40/100	0.0887	0.0985	0.0936	0.0069

Determinación de Acetato de Etilo

Fermentaciones	Destilado 1	Destilado 2	Promedio	σ
20/30/100	0.0216	0.0144	0.0180	0.0051
20/30/51/49	0.0179	0.0297	0.0238	0.0083
10/30/51/49	0.0276	0.0416	0.0346	0.0099
10/30/100	0.0033	0.0189	0.0111	0.0110
10/40/51/49	0.0098	0.0126	0.0112	0.0020
10/40/100	0.0030	0.0039	0.0034	0.0006
20/40/51/49	0.0028	0.0048	0.0038	0.0014
20/40/100	0.0042	0.0046	0.0044	0.0003

Determinación de Metanol

Fermentaciones	Destilado 1	Destilado 2	Promedio	σ
20/30/100	0.4715	0.3241	0.3978	0.1042
20/30/51/49	0.4389	0.7297	0.5843	0.2056
10/30/51/49	0.6570	1.1294	0.8932	0.3340
10/30/100	0.0435	0.0891	0.0663	0.0322
10/40/51/49	0.2576	0.3890	0.3233	0.0929
10/40/100	0.3077	0.4023	0.3550	0.0669
20/40/51/49	0.1008	0.0764	0.0886	0.0173
20/40/100	0.3027	0.3359	0.3193	0.0235