



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

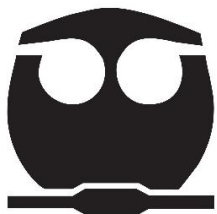
**IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS QUE
PARTICIPAN EN LA FERMENTACIÓN NATURAL
PARA LA PRODUCCIÓN DE SOTOL.**

TESIS

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

PRESENTA:

BRENDA MARGARITA FRANCO DIAZ



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Ruíz Terán Francisco.

Vocal: Quirasco Baruch Maricarmen.

Secretario: Mina Cetina Aleida.

1er. Suplente: Juárez Arroyo Elsi Ideli.

2do. Suplente: Jiménez Reyes Genaro.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 321 del Departamento de Biotecnología y Alimentos en el Conjunto E de la
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dr. FRANCISCO RUÍZ TERÁN

Sustentante: BRENDA MARGARITA FRANCO DIAZ

Agradecimientos académicos

Un agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la terminación de mis estudios de licenciatura, durante el período de mayo a octubre de 2017, mediante el proyecto CB-2015-01 258436.

Y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca otorgada para la realización de mi tesis de licenciatura, durante el período de febrero a junio del 2018 mediante el proyecto IN216618.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS	VI
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades sobre el Sotol y su producción en el estado de Chihuahua	3
2.2 Elaboración artesanal del Sotol	5
2.3 <i>Dasyilirion</i>	13
2.3.1 Clasificación y distribución geográfica	14
2.3.2 Condiciones climáticas	15
2.3.3 Descripción botánica	15
2.3.4 Reproducción	17
2.3.5 Aprovechamiento de la planta	17
2.3.6 Metabolismo	18
2.4 Composición química de <i>Dasyilirion</i>	18
2.4.1 Inulina	19
2.5 Reacción de Maillard de la fructosa	21
2.5.1 Productos de la reacción de Maillard que inhiben el crecimiento de las levaduras	22
2.6 Las levaduras	23
2.6.1 El género <i>Saccharomyces</i>	24
2.7 Bioquímica de la fermentación alcohólica	25
2.7.1 Etanol	26
2.8 Plantas empleadas y microorganismo que se han reportado en la producción de Sotol y en bebidas parecidas.	28
2.9 Métodos moleculares de identificación de levaduras	30
2.9.1 Métodos basados en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas	30
2.9.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras	34
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVO	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivo particular.	34
5. JUSTIFICACIÓN	34
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 Toma de muestra	36
7.2 Análisis químico de los mostos de Sotol a lo largo de la fermentación	37
7.2.1 Determinación de sólidos solubles (°Bx) de los mostos	37
7.2.2. Medición del pH en las muestras de mosto de <i>Dasyilirion</i>	37
7.2.3 Determinación de la acidez en las muestras de mosto de <i>Dasyilirion</i>	37
7.2.4 Determinación y cuantificación de carbohidratos y etanol presentes en los distintos	37

tiempos de fermentación de las muestras de mosto de Sotol mediante la técnica de HPLC-RI	
7.3 Análisis microbiológico de los mostos a lo largo de la fermentación.	38
7.3.1 Siembra de los mostos y observación de las levaduras	38
7.3.2 Conteo de las cajas sembradas y conservación de las colonias seleccionadas.	38
7.3.3 Extracción de ADN de las cepas aisladas de los mostos	39
7.3.4 Cuantificación del ADN, método espectrofotométrico.	40
7.3.5 Amplificación de la región 5.8 S r RNA-ITS	40
7.3.6 Análisis de restricción de los amplicones	41
7.3.7 Identificación con base de datos	41
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
8.1 Análisis químico de los mostos de Sotol a lo largo de la fermentación	42
8.1.1 Determinación de sólidos solubles (°Bx) de los mostos de Sotol a lo largo de la fermentación	42
8.1.2 Medición de pH y detreminación de la acidez en los mostos de Sotol	43
8.1.3 Determinación y cuantifiación de carbohidratos y etanol presentes en los distintos tiempos de fermentación de las muestras de mostos de Sotol mediante la técnica de HPLC-RI	44
8.1.4 Rendimiento de la fermentación	46
8.1.5 Determinación de carbohidratos no fermentables en los ditintos tiempos de fermentación de las muestras de mosto de Sotol, mediante la técnica de HPLC.	47
8.2 Análisis microbiológico de los mostos de Sotol a lo largo de la fermentación	48
8.2.1 Cuenta en placa de las levaduras a lo largo de la fermentación sobre medio YEA	48
8.2.2 Observación de la morfológica de las levaduras cultivadas en placa	49
8.2.3 Obsevaciones microscópicas de las cepas aisladas	50
8.2.4 Extracción del ADN de las cepas aisladas de los mostos a lo largo de la fermentación	51
8.2.5 Identificación molecular de las cepas por el método PCR-RFLP 5.8S-ITS	52
8.2.5.1 Amplificaciones de la región 5.8 S-ITS de algunas cepas aisladas	52
8.2.5.2 Análisis de restricción de los amplicones	53
8.2.5.3 Secuenciación de la región 5.8S-ITS de algunas cepas aisladas en mostos de Sotol	55
9. CONCLUSIONES	59
10. PERSPECTIVAS	59
11. BIBLIOGRAFÍA	61
12. ANEXO	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sotol con víbora.	5
Figura 2. Selección de la planta.	6
Figura 3. Preparación de los hornos de cocción.	7
Figura 4. Cubierta de los hornos.	8
Figura 5. Tallos al término de la cocción.	8
Figura 6. Molienda de los tallos.	9
Figura 7. Fermentación en las pilas.	10
Figura 8. Destiación.	11
Figura 9. Maduración.	12
Figura 10. Preparados.	13
Figura 11. Clasificación taxonómica del género <i>Agave</i> .	13
Figura 12. Clasificación taxonómica del género <i>Dasyilirion</i> .	14
Figura 13. Tipo de inflorescencia.	16
Figura 14. Tamaño de inflorescencia.	16
Figura 15. Fruto de la planta.	16
Figura 16. Estructura molecular básica de los fructanos.	20
Figura 17. Síntesis de etanol a partir de piruvato	27
Figura 18. Estructura del ADN ribosomal nuclear	31
Figura 19. Mapa de Chihuahua.	36
Figura 20. Ejemplo de algunas extracciones de DNA.	51
Figura 21. Amplificación de la región 5.8S-ITS de algunas cepas aisladas.	52
Figura 22. Algunos perfiles de restricción de cepas aisladas.	53
Figura 23. Algunos perfiles de restricción de cepas aisladas	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. °Bx a lo largo de la fermentación.	43
Gráfica 2. Cambio de pH de los mostos a lo largo de la fermentación.	44
Gráfica 3. Determinación de la acidez en los mostos.	44
Gráfica 4. Concentración de fructosa.	45
Gráfica 5. Concentración de etanol.	46
Gráfica 6. Cuenta total de levaduras.	48

ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla 1. Principales empresas productoras de Sotol en Chihuahua.	5
Tabla 2. Tabla para estimar el peso del tallo (kg).	17
Tabla 3. Caracterización química de <i>Dasytirion</i> .	18
Tabla 4. Grado de polimerización estimado para los fructanos.	20
Tabla 5. Tipos de <i>Agaves</i> empleados y microorganismos reportados en Mezcal.	28
Tabla 6. Tipos de <i>Agaves</i> empleados y microorganismos reportados en Tequila.	28
Tabla 7. Tipos de <i>Agaves</i> empleados y microorganismos reportados en Bacanora.	29
Tabla 8. Tipos de <i>Dasytirion</i> empleados y microorganismos reportados en Sotol.	29
Tabla 9. Grupos morfológicos de las colonias aisladas.	49
Tabla 10. Fenotipos de las distintas levaduras encontradas	50
Tabla 11. Tamaño del amplicón y de los fragmentos de restricción.	54
Tabla 12. Identificación por comparación de secuencias.	55
Esquema 1. Estrategía experimental.	35

1. INTRODUCCIÓN

El Sotol es una bebida destilada obtenida a partir de la fermentación de los azúcares que provienen de los tallos cocidos de las plantas del género *Dasyliirion* y después de la destilación de ese mosto o sustrato.

Se produce de forma artesanal e industrial en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango. Se han encontrado indicios de su preparación desde tiempos prehispánicos en la zona arqueológica de Paquimé al norte de Chihuahua (Comisión Nacional para el Desarrollo de Pueblos indígenas, 2014)

El proceso para la elaboración del Sotol consiste en la selección de la planta, el corte de la planta, el corte de las hojas de la planta para extraer los tallos (jima), la cocción de los tallos, la molienda de los tallos cocidos (majado), la fermentación y una doble destilación.

Existen datos sobre algunas de las levaduras involucradas en la fermentación del Sotol (De La Garza, 2000). El objetivo del presente es ampliar el estudio sobre la diversidad de levaduras que están participando en esta fermentación lo que ayudará eventualmente a controlar el proceso de fermentación, entender los componentes que estas levaduras están produciendo durante la fermentación y por otro lado proponer si estas levaduras pudieran ser utilizadas en otras fermentaciones.

La identificación de levaduras requiere del empleo de varias metodologías para realizar una caracterización adecuada de los mismos. La identificación de levaduras se hace tradicionalmente con base en sus características morfológicas y fisiológicas, este procedimiento requiere de por lo menos 60 ensayos, además de implicar tiempo, recursos y experiencia no asegura una buena identificación (Barnett *et al.*, 2000).

Por otra parte los métodos moleculares que se emplean para la identificación ofrecen una buena alternativa para identificar a los organismos a nivel de especie y subespecie con menos tiempo y trabajo.

Existen métodos que emplean la comparación de secuencias parciales de los genes que codifican al ARN ribosomal (rARN) por otra parte existen otros que no requieren de la secuenciación para la identificación por ejemplo, el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) éste tiene algunas ventajas en cuanto a rapidez,

facilidad y reproducibilidad (Scott, 2000). El RFLP de un producto de PCR de la región comprendida por los espaciadores internos transcritos (ITS 1, ITS 2) es utilizado para la identificación de levaduras. Esta metodología ha demostrado una mayor resolución a nivel de identificación de especies que la utilizada a partir de la secuencia de los genes rDNA 18 S o 26S (Esteve-Zarzoso, *et al*, 1999; Kurtzman *et al*, 1992) y ésta se ha utilizado ampliamente en la identificación de levaduras presentes durante la elaboración de vinos y jugos de fruta (Beltrán *et al*, 2002; Sabate *et al*, 2002; Fernández *et al*, 2000).

En el presente trabajo se aislaron e identificaron algunas levaduras que participan en la fermentación de mostos de *Dasyilirion* durante la elaboración de Sotol.

Estas levaduras fueron identificadas mediante un método de análisis de los patrones de restricción (RFLP) del producto de amplificación por PCR del complejo del gen rRNA 5.8S-ITS y los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron cortados con las enzimas de restricción: *Hae III*, *Hinf I* y *CfoI*, y se compararon con los patrones obtenidos en las bases de datos yeast-id actualizada por última vez el 16 de octubre de 2015 y la reportada por Esteve-Zarzoso y col., 1999.

En los casos en los que los perfiles de restricción no fueron suficientes para establecer la identidad del microorganismo se amplificó y secuenció la región ITS-5.8 S ARNr.

Se establecieron las poblaciones dominantes en el transcurso de la fermentación.

Posteriormente se identificaron los carbohidratos fermentables y no fermentables presentes en las muestras de mosto de Sotol mediante cromatografía de líquidos, así como la cantidad de alcohol que se produjo durante la fermentación.

Así mismo se midieron algunos parámetros fisicoquímicos como °Brix, pH y acidez.

El resultado de esta investigación servirá como base para posteriores pruebas fisiológicas que determinen las condiciones de la fermentación dirigida logrando procesos de elaboración estandarizados y así obtener una bebida con características específicas. Así mismo, ayudar a completar la información sobre la diversidad de levaduras que están participando en esta fermentación. Y proponer qué levaduras pudieran ser utilizadas en otras fermentaciones.

2. ANTECEDENTES

En México existe una extensa variedad de bebidas tradicionales producidas en distintas regiones, como lo son: Bacanora, Charanda, Mezcal, Tequila, Pulque, Tejuino, Tepache, Sotol, entre otras; esta diversidad de bebidas alcohólicas tienen una gran relevancia por su impacto social, cultural y económico en diferentes comunidades donde se producen (Cova, 2010)

2.1 Generalidades sobre el Sotol y su producción en el estado de Chihuahua.

El Sotol es una bebida destilada con una graduación alcohólica mínima de 35% y máxima de 55% (en cualquiera de sus clasificaciones) obtenida a partir de la fermentación y destilación de los tallos de las plantas de *Dasyliirion*.

En 2002, el Sotol adquiere la denominación de origen, otorgada por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), señalando que el Sotol es la bebida alcohólica que se obtiene de las plantas conocidas como Sotol o Sereque, obtenidas de poblaciones naturales y cultivadas en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2002).

Cuenta con una norma, Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCF-2004. Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba. En dónde definen al Sotol como:

“Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica ubicada dentro de la denominación de origen, derivado de la molienda de las cabezas maduras de *Dasyliirion spp.*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido por otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49%, en la inteligencia de que en esta acción o mezcla no están permitidas las mezclas en frío. El Sotol es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas, o cuando se aboque sin madurarlo”

El Sotol se diferencia del Tequila o el Mezcal en el proceso de elaboración y principalmente en la materia prima con que se elabora, el Tequila se obtiene de *Agave tequilana weber variedad azul*, el Mezcal puede prepararse con distintas especies de Agave

como: *A.salmiana otto*, *A.weberi cela*, *A. esperrima jacobi*, *A. potatorum zucc* y *A.angustifolia haw* (Andrade, 2006) mientras que el Sotol no se obtiene de una *Agavaceae* si no de una *Lilliaceae* llamada *Dasyilirion*.

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el Sotol se clasifica en 4 tipos: Sotol blanco, Sotol joven, Sotol reposado y Sotol añejo.

Sotol blanco: Producto cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

Sotol joven: Producto susceptible de ser abocado, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Sotol blanco con Sotol reposado y/o añejo de 1 a 2 meses, se considera como sotol joven u oro.

Sotol reposado: Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes Sotoles reposados, la edad para el Sotol resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

Sotol añejo: Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, cuya capacidad máxima sea de 210 litros u otras alternativas tecnológicas y con una graduación alcohólica comercial que debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes Sotoles añejos, la edad para el Sotol resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

Aunque no esté permitido o no se mencione en la norma, se suelen comercializar preparados o curados de crema, hierbas, frutas, semillas, licor de café, oro o con víbora, este último mostrado en la (Figura 1).



Figura 1. Sotol con víbora

Chihuahua es el estado que más industrializa el Sotol. El estado de Chihuahua produce unos 300,000 litros al año de esta bebida. (Comarca, 2012).

Contando con distintas empresas productoras de Sotol, mostradas en la (Tabla 1).

Tabla 1. Principales empresas productoras de Sotol en Chihuahua (Bautista, 2013).

Marca	Empresa	Ubicación
Sotol Hacienda	Vinomex	Hacienda Tabaloapa, Chihuahua
Don Cuco Sotol	Compañía elaboradora de sotol S.de R.L.	Janos, Chihuahua
Cinco Tragos Sotol	Casa Sotolera	Samalayuca, Chihuahua
Sotol 219	Cueva blanca	Hidalgo de Parral, Chihuahua

2.2 Elaboración artesanal del Sotol

A continuación se describe el proceso de elaboración en la región de Aldama que es muy parecido al de otras Sotolerías con algunas variaciones entre productores, sobre todo en tiempos de fermentación y utensilios usados en la elaboración.

Selección de las plantas.

El Jimador selecciona plantas con una madurez adecuada, se cortan cuando alcanzan la madurez entre los 8 y 10 años de edad o cuando las plantas comienzan a dar señales de

iniciar la floración lo que comúnmente se llama brote de quiote, ilustrado en el inciso A de la (Figura 2).

Entonces inicia el proceso llamado Jimado que consiste en cortar con un machete todas las hojas de la planta para extraer los tallos. Estos tallos son extraídos durante los meses de invierno, como se muestra en el inciso B de la (Figura 2).

Resultados sobre los contenidos de azúcares en tallos cortados en distintas épocas del tallo muestran que el mayor contenido de azúcar es durante los meses de invierno. (De La Garza, 2000).

Son transportados en “trocas” hasta la “sotolería” o “vinata” (lugar donde se produce el Sotol) que suele estar en las cercanías para vender los tallos y después ser procesados a la brevedad para evitar su deshidratación, inciso C y D de la (Figura 2).

El precio por kilogramo de tallo de *Dasyliirion* varía entre los \$0.50 hasta los \$2.00 pesos, el precio promedio es de \$0.87 pesos, el precio varía dependiendo de la época del año, oferta y demanda.



Figura 2. Selección de la planta: A y B) corte de las hojas de la planta, C) transporte de los tallos extraídos hasta la Sotolería, D) Tallos recién llegados a la Sotolería. Imágenes: A, B y C (TV UNAM, 2017)

Cocción de los tallos

En la Sotolería tienen hornos excavados bajo la tierra cuyas dimensiones varían con el productor, regularmente son de 3 a 8 metros de diámetro, como el mostrado en el inciso A de la (Figura 3).

En estos hornos se pone leña y piedras, en cierto momento (aproximadamente 5 horas) la leña se termina (no se mete más leña) pero la piedra queda muy caliente y en ese momento se empieza a meter una cubierta de hojas, tierra y bagazo de alguna fermentación anterior y sobre esta cubierta se meten los tallos enteros, aunque en algunos casos dependiendo del tamaño del tallo se pueden cortar en 2 partes, estos pasos se ilustran en los incisos B, C y D de la (Figura 3).



Figura 3. Preparación de los hornos de cocción: A) Horno de cocción vacío, B) leña empleada C) Leña encendida para el calentamiento del horno D) introducción de los tallos. Imágenes: C y D (TV UNAM, 2017).

Tapan con tierra, hojas y lonas el horno de cocción para evitar que el calor y la humedad se escapen; tal y como se observa en el inciso A del (Figura 4).

Rocían con agua. Y se deja cociendo durante 2 a 4 días dependiendo la cantidad de tallos, el clima y la experiencia del productor; inciso B de la (Figura 4).

El proceso de cocción tiene una doble finalidad, suavizar los tallos para poder molerlos y lo más importante, hidrolizar los carbohidratos del tallo, principalmente los fructanos.



Figura 4. Cubiera de los hornos. A) Productores tapando con tierra y hojas el horno de cocción. B) Rocío con agua del horno de cocción (TV UNAM, 2017).

Durante este paso, algunos de los azúcares son caramelizados y se generan furfurales.

(Pinal, 2001) en un estudio en *Agave*, mostró que la concentración de furfural, 5-hidroximetil furfural, 5-metil furfural y 2-acetil furano aumentaron con la duración de la cocción. Estos compuestos son importantes ya que pueden influir en la velocidad de la fermentación así como en las características organolépticas del producto final.

Al término de la cocción y antes de sacar los tallos del horno los humedecen y se dejan enfriar de 1 a 2 días, como se ejemplifica en la (Figura 5).

En esta etapa ocurre el tiempo cero de fermentación, la cual es una fermentación sólida.



Figura 5. Tallos al término de la cocción A) Tallos justo al término de la cocción B) Tallos fríos reposando (TV UNAM, 2017).

Molienda de los tallos.

Posteriormente se realiza el "majado" que es una molienda de los tallos cocidos, se cortan con hacha o una trilladora en trozos pequeños y después quedan fibras pequeñas parecidas a cañas cocidas (y con sabor muy dulce), esta etapa se ejemplifica en la (Figura 6).



Figura 6. Molienda de los tallos: A) Tallos listos para ser cortados B) Tallos molidos en trozos o fibras pequeñas C) Trilladora empleada para moler las piñas. D) Molienda con hacha. Imágenes A, B y D (TV UNAM, 2017).

La fermentación

Las fibras se colocan en las "pilas", "tinajas" o "cajones" que son elaboradas de madera, de cemento o de plástico, mostrados en la (Figura 7).

Se coloca agua en una proporción 2:1. Se deja reposar la "fibra" con el agua de 4 a 7 días, sin cubrir y removiendo en intervalos irregulares según el productor.

Cunado se produce Sotol 100% *Dasyllirion*, la única fuente de carbohidratos son los fructanos hidrolizados de *Dasyllirion*. Para otro tipo de Sotol, la norma permite el uso de otros azúcares en cantidades de hasta el 49% en peso en la formulación del mosto. No hay una especificación legal acerca de la fuente del azúcar adjunto y teóricamente, cualquier tipo de azúcar fermentable esta permitida en la formulación del mosto. En la práctica y desde un punto de vista económico, se usa azúcar de caña, piloncillo (conos marrones de jugo de caña completamente cristalizada, a veces individualmente envueltos en hojas de

maíz o caña y empacados en seco), melaza de caña o jarabe de maíz hidrolizado (Cedeño, 2003).

Conforme transcurre la fermentación, el maestro Sotolero prueba en varias ocasiones el mosto (vino de Sotol, como ellos le llaman) y las fibras para determinar el avance de la fermentación, esta se detiene cuando se detecta un sabor y aroma a etanol y una disminución de sabor dulce.

Algunos productores están implementando el uso de densímetros y refractómetros para ver los cambios en el proceso.

El contenido de azúcar disminuye de un 4-11% m/v (lo que equivaldría a una concentración inicial de azúcares solubles menores a 12 °Bx) hasta un 5% m/v (menor a 5° Bx). El pH reportado, inicia en 4.5 y disminuye hasta 4 al final de la fermentación. El contenido alcohólico reportado al final de la fermentación esta entre los 4 y 9% (De la Garza, 2000; Cedeño, 2003).



Figura 7. Fermentación en plias: A) Pilas de fermentación de cemento y de plástico. B) Tinajas de fermentación de madera.

Destilación

La destilación consiste en la separación de los componentes en función de su volatilidad en el punto de ebullición (punto de destilación). El material a destilar es un mezcla de agua, etanol y otros compuestos de diversas volatilidades, el líquido alcohólico a destilar tiene una composición muy compleja, de manera que pasan en la destilación, no solamente alcohol, sino otros compuestos volátiles como son aldehídos, éteres, ácidos y alcoholes superiores (Varnam, 1994)

Una vez concluida la fermentación se lleva el jugo y la fibra (esta mezcla también contiene sólidos del tallo, celulosa, pectina, células de levaduras, proteínas, sales minerales y

algunos ácidos orgánicos) a un aparato de destilación rudimentario construido con ollas de barro, o cobre conocido como “alambiques”.

En este recipiente meten leña y calientan, sellan la tapa con lodo o bagazo, al ebullición el líquido, el vapor se condensa en una tapa metálica (enfriada con agua corriente) que funciona como refrigerante, pasa por un serpentín y se obtiene el líquido en un carrizo que desemboca en el recipiente de recolección (Figura 8).



Figura 8. Destilación. A y B) Distintos alambiques, se observa que están sellados con lodo y bagazo. C) Obtención del líquido en un carrizo que desemboca en un recipiente de recolección.

Imágenes B y C (TV UNAM, 2017).

El proceso de destilación en Sotol, la composición de las fracciones obtenidas y la concentración de etanol a la cual termina la destilación, aún no están descritas. Reportes en *Agave* estudiados por Cedeño (2003) y Andrade (2006) mencionan que en este proceso se obtienen tres fracciones, la primera fracción se le denomina “cabeza”, comienza a recolectarse (después de tomar y desechar 15 mL del líquido que sale al inicio de la destilación) y tiene 40-45° de alcohol. Esta fracción se obtiene cuando aproximadamente la mitad del volumen de la olla se ha evaporado. Asimismo mencionan que esta fracción es rica en compuestos con bajo punto de ebullición como acetaldehídos, etil acetato, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol y 2-metil propanol.

Después se obtiene la segunda fracción llamada “corazón” a $\frac{3}{4}$ del volumen de la olla y tiene menor cantidad de alcohol 30-32°.

Por último, del $\frac{1}{4}$ de volumen restante se obtiene un licor de muy baja calidad que muy pocos productores destilan y lo llaman “cola”. Esta fracción contiene compuestos con alto punto de ebullición, como alcohol isoamílico, alcohol amílico, 2-furaldehido, ácido acético y etil acetato.

Cedeño (2003) y Andrade (2006) manifiestan que la destilación termina cuando la concentración de alcohol llega aproximadamente a 12° G.L.

La cabeza y el corazón se destilan nuevamente para incrementar la cantidad de alcohol.

En procesos similares como es en el caso del Tequila la concentración promedio de alcohol después de la segunda destilación es de 50 ° G.L.

El producto obtenido se almacena en tanques de plástico y posteriormente se envasa en botellas de vidrio para su venta individual.

Se puede comercializar tal y como se obtiene después de la segunda destilación llamado Sotol blanco, a un precio aproximado de 320 pesos el litro. Cabe mencionar que se obtienen 1 L de Sotol de un lote de tallos de *Dasyliirion* de entre 5-7 kg.

Maduración

Para el Sotol reposado o añejo se lleva a cabo la maduración en barricas de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas de una capacidad máxima de 210 L (Figura 9). El tiempo legalmente requerido es de 2 meses para los reposados y 12 meses para los añejos. El espesor y la calidad de la madera, la profundidad del tanque, la temperatura y humedad en el área de barriles, la longitud del almacenamiento, el número de ciclos o reusos que se le hayan dado al barril afectan el sabor y aroma final de la bebida.



Figura 9. Maduración: A y B) Barricas empleadas para producir Sotol añejo. Imágen B (TV UNAM, 2017).

Preparados

En otros casos se les añaden ingredientes como: hierbas, crema, frutas, mermeladas, semillas, café, oro y el más popular, víbora (Figura 10)



Figura 10. Algunos preparados: A) Preparado con Damiana, B) Preparados con frutas.

2.3 *Dasyilirion (zucc.) zucc.1838*

En cuanto a este género se encuentra dentro del mismo orden que los *Agaves*, *Liliales*, lo cual se debe a que poseen características similares tal como la morfología, distribución geográfica y características del pólen, sin embargo, presentan diferencias genéticas en cuanto al número de cromosomas, motivo por el cual *Dasyilirion* se clasificó dentro de otra familia, la *Liliaceae* (Figuras 11 y 12) (USDA Plants Data Base).

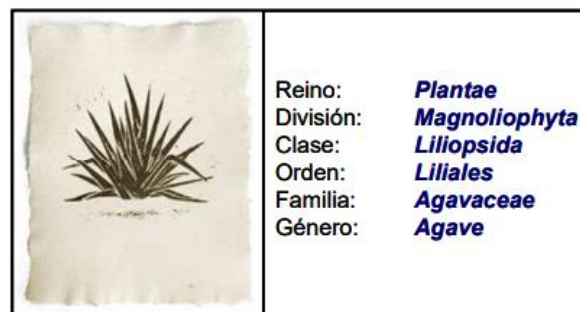


Figura 11. Clasificación taxonómica del género *Agave* (USDA Plants Data Base).



Figura 12. Clasificación taxonómica del género *Dasyilirion* (USDA Plants Data Base).

2.3.1 Clasificación y distribución geográfica

La planta pertenece al género *Dasyilirion* perteneciente a la familia *Neolinacea*, la cual comprende cerca de 200 géneros y 2500 especies (Cronquist, 1981).

Se han identificado alrededor de 15-16 especies de *Dasyilirion* distribuidas en los estados de Chihuahua, Sonora, Coahuila, Durango, Zacatecas, Nuevo León y San Luis Potosí, Texas y Arizona (Rzedowski, 1998; Palma, 2000; Velasquez, 1983; Rivera, 1987).

Estas especies son y se encuentran en...

Dasyilirion duranguense Trel (Durango).

D.wheeleri S. Watson (Sonora y Chihuahua)

D.palmeri Trel (Coahuila)

D.cedrosanum Trel. (Coahuila, Zacatecas y Durango)

D.lucadum Trel.

D.parrianum Trel (San Luis Potosí)

D.leiophyllum Engelm.ex Trel. (Chihuahua, Texas y Nuevo México)

D.texanum Scheele (Texas)

D.simples Trel (Durango)

D.glaucaphy Lum (centro de México)

D.acroticha Zucc

D.graminifolium Zucc (Sonora)

D. carratiphodium Zucc (Oaxaca)

D. wislezen Trel (Arizona)

D.longissimus Lemaire

En Chihuahua se distribuyen a lo largo del desierto de Chihuahua, en las Barrancas del suroeste y oeste de Chihuahua, en los límites con Sonora entre los 1800 a 1900 msnm. Se han localizado plantas de *Dasyilirion* en los límites de Coahuila, municipio de Jiménez, Sierra del Diablo, los Remedios, Sierra de Coyame, Sierra de Matasaguas, Nicolás Bravo, Municipio de Ojinaja, Madera, Ignacio Zaragoza, Casas Grandes, Janos.

Dasyilirion duranguense, *Dasyilirion cedrosanum* y *Dasyilirion wheeleri* son las especies más usadas para producir la bebida alcohólica (Contreras, 2005).

2.3.2 Condiciones climáticas

Se les encuentra en regiones desérticas y semidesérticas, en clima árido y semiárido tipo seco desértico, en suelos ácidos (pH menor a 5.9) y arcillo-arenosos con contenidos de materia orgánica superior al 1.5% (Sierra, 2008). La planta puede sobrevivir a muy bajas temperaturas, así como a veranos muy calientes, el rango altitudinal donde se localiza, se ubica entre los 1,400 y 1,900 m.s.n.m, con en el tipo de vegetación matorral serófilo la cual ocupa el 40% de superficie del país y por consiguiente el más vasto de todos los tipos de vegetación de México.

2.3.3 Descripción botánica

Las hojas de la planta son perennes y alargadas de color verde claro a verde grisáceo, con espinas en los márgenes recubiertos de una capa de hidrocarburos que forman una cutícula gruesa (Reyes, 2013). Todos los *Dasyllirion* de Chihuahua presentan espinas bien desarrolladas en los costados de las hojas, que varían de largo de 1 a 4 mm. Esta es una característica taxonómica importante pues divide a las especies con espinas curvadas hacia la base de la hoja, de las especies con espinas curvadas hacia el ápice (Sierra, 2008).

Se caracteriza por tener una raíz fibrosa, poco profunda, ramificada y extendida, las cuales surgen del tronco o cabeza, que es gruesa, carnosa y de tamaño regular (Velásquez, 1983).

Sus flores varían de acuerdo al tipo de planta, ya que existen plantas masculinas y femeninas (estaminadas y pistiladas) (Figura 13).

Cuando la inflorescencia es estaminada, la flor se presenta de color amarillo brillante, debido a la dehiscencia del pólen, lo cual permite verlas a una gran distancia. Para la inflorescencia pistilada, cuando esta la flor completa, es muy estrecha, con las brácteas de los fascículos sostenidos al tallo, la inflorescencia tiene un dominante color verde o púrpura, tienen un periodo de floración más corto y puede ser más rápidamente polinizadas.



Figura 13. Tipo de inflorescencia. Flor estaminada (macho) a la izquierda, flor pistilada (hembra) a la derecha.

El tamaño de la inflorescencia varía desde un metro en plantas jóvenes hasta cinco o seis metros en las plantas adultas y aparece en el centro de la corona (Figura 14).



Figura 14. Tamaño de inflorescencia en *Dasyliirion*.

En la flor el perianto es de 2 a 2.5mm de largo; sépalos y pétalos finos, blanquecinos, los estambres más largos que el perianto, de filamento delgado, frutos pequeños, capsular, alados; con la semilla encerrada en la parte central (García, 1952)



Figura 15. Fruto de la planta.

Las semillas tienen tres lados, son color café-oro, con textura plana-rugosas. Se estima que el ciclo de floración es de seis años (USDA Plants Data Base). Lo que hace que la producción de semillas no sea constante o igual cada año, por lo que hay más probabilidad que se produzcan semillas cada seis años (López, 2002).

2.3.4. Reproducción

Puede reproducirse de forma sexual o asexual.

Reproducción sexual: Al hacer explosión la cápsula y esparcir las semillas alrededor de la planta, se logra un porcentaje muy bajo de germinación, en promedio diez plantas pequeñas por cada planta madre y requieren un promedio de 12 a 15 años para tener un tamaño ideal para ser aprovechadas (Ortega, s.f).

Reproducción asexual: A partir de alguna parte vegetativa de la planta como tallos, raíz, hojas, etc.

2.3.5 Aprovechamiento de la planta

Estas plantas viven por más de 100 años, sin embargo la edad óptima para utilizarla para la producción del licor es a los 10 años de edad. Cuando el tallo esta lista para ser cortado tiene un peso entre 20-40 Kg, sin embargo, tallos más viejos llegan a tener un peso de hasta 100 Kg o más (De la Garza, 2008).

Zárate (2002) elabora una estimación de producción de Sotol, en kg, a partir del diámetro de la piña en cm, con la finalidad de tener una aproximación de su peso, antes de cortar la planta, datos mostrados en la (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla para estimar el peso del tallo (kg) en relación con el diámetro (cm) del tallo. (Zárate, 2002)

Diámetro (cm)	Peso estimado (kg)	Límite inferior (kg)	Límite Superior (kg)
18-20	12.655	10.5788	14.6962
21-25	15.654	12.7738	18.5333
26-30	20.207	17.1471	23.3026
31-35	25.652	22.3578	29.0970
36-40	31.990	28.3086	35.9928
41-45	39.221	34.9393	43.9742
46-50	47.345	42.2802	52.9885
51-55	56.361	50.3823	63.0009
56-60	66.270	59.2764	73.9938
61-65	77.071	68.9776	85.9583

2.3.6 Metabolismo

La mayoría de las plantas fijan el bióxido de carbono durante la fotosíntesis en presencia de luz solar. Bajo estas condiciones, los estomas se encuentran abiertos y presentan una gran pérdida de humedad. Algunas plantas que evolucionaron en condiciones de poca humedad modificaron su metabolismo con la finalidad de ahorrar agua. Así los estomas sólo se abren en la oscuridad para tomar el bióxido de carbono y se cierran durante el día. Este tipo de metabolismo se encontró por primera vez en plantas de la familia *Crassulaceae* y se llamó metabolismo ácido de las crasuláceas y a las plantas que lo presentan se les denomina tipo CAM (Valenzuela-Zapata, 1997).

La más importante adaptación fisiológica de las plantas de *Agave* y *Dasyllirion* es su metabolismo tipo CAM (Santamaría y col., 1995).

Sánchez Marroquín y Hope (1953) reportaron que el principal producto fotosintético de estas plantas son los fructanos. Los fructanos en las plantas de *Agave* y *Dasyllirion* son sintetizados y almacenados en el tallo y su principal función es como carbohidratos de reserva. También se ha reportado que actúan como osmoprotectores en medio ambiente de sequía o bajas temperaturas, constituyendo quizás otra posible adaptación fisiológica hacia climas extremos (Wang y Nobel, 1998).

2.4 Composición química de *Dasyllirion*

Cruz *et al.*, (2013) realizaron el análisis químico de *Dasyllirion* y encontraron los datos mostrados en la Tabla 3

Tabla 3. Caracterización química de *Dasyllirion* (Cruz *et al.*, 2013)

Parámetro	Porcentaje (%)
Humedad	69.24
Fibra cruda	9.63
Azúcares totales	5.89
Azúcares reductores	3.53
Grasa	0.78
Proteínas	0.49

El porcentaje de agua presente en *Dasyllirion* es menor al reportado en otras plantas similares. Gallegos *et al.*, (2006) reportaron que *Agave angustifolia* tiene 90.8% y Enriquez, (2016) reportó entre un 70-85% de agua.

La fibra cruda esta constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina (Kirk et al., 1996).

En *Agave* (Enriquez,2016) reportó la presencia de celulosa y lignina en un 2- 5.7% y 3-5%, respectivamente.

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores (dadores de electrones) con otras moléculas que actuarán como oxidantes (aceptando electrones). En este grupo se encuentran algunos monosacáridos como la glucosa, fructosa y algunos disacáridos como la celobiosa (Lehninger, 1988).

De La Garza, *et al.*, (2008) mencionan que los carbohidratos más importantes en *Dasyllirion* son los polisacáridos de inulina, los fructanos, monosacáridos de fructosa y en menor cantidad glucosa.

Escalante-Minakata, *et al.*, (2012) mencionan que los fructanos representan el 60% del total de carbohidratos solubles en este tipo de plantas.

El siguiente grupo esta formado por grasas, aceites y sustancias solubles en grasa, cuya función en las plantas es formar parte de sus células y no como reserva energética (Baudi, 1999).

2.4.1 Inulina

La inulina es un fructano, un polisacárido almacenado en muchas plantas. Esta estructura consiste de una cadena lineal de enlaces β (2-1) fructosilfructosa; al final de la cadena está presente una unidad de glucosa a través de un enlace tipo sacarosa, las unidades de fructosas enlazados a la glucosa terminal puede variar desde algunas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un polifrufructano con grado de polimerización (DP) mayor a 30 unidades, su estructura puede ser lineal o ramificada y algunas veces cíclica (Ricca et al., 2007).

La hidrólisis completa de la inulina genera fructosa y glucosa con un grado de concentración proporcional al DP inicial del polisacárido. El DP y la ramificación dependen del origen vegetal de la inulina.

En el caso de las especies de *Agave* ha sido reportada más de una estructura para los fructanos, como se muestra en la (Tabla 4). Por ejemplo, López y col. (2003) reportaron la estructura molecular para los fructanos de *A. tequilana var. azul*, como una mezcla compleja de fructooligosacáridos presentando principalmente enlaces $\beta(2-1)$, pero también observaron enlaces del tipo $\beta(2-6)$, con ramificaciones y con glucosa terminal o interna (Figura 16).

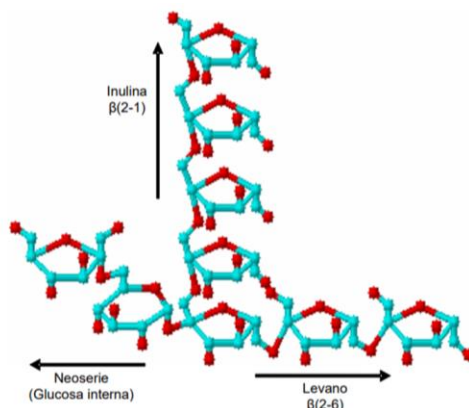


Figura 16. Estructura molecular básica de los fructanos de *A. tequilana var. azul*.
Fuente: López y col. (2003)

Mancilla- Margalli y López, (2006) proponen que los fructanos de *Dasyllirion* pueden presentar dos tipos de moléculas (graminanos y agavinas) con un grado de polimerización de 9 (Tabla 4). Estudios más profundos de la estructura de los fructanos en *Dasyllirion* en particular, todavía no está descrito.

Tabla 4. Grado de polimerización estimado para los fructanos de *Agave spp.* y *Dasyllirion sp.*

Grupo	DP estimado
I	
<i>A. angustifolia</i> Oax	32
<i>A. tequilana</i> Jal	18
<i>A. potatorum</i> Oax	15
<i>A. angustifolia</i> Son	13
II	
<i>A. cantala</i> Oax	11
<i>Dasyllirion</i> sp. Chih	9
<i>A. fourcroydes</i> Yuc	6
III	
<i>A. tequilana</i> Gto	7

Fuente: Mancilla-Margalli y López. 2006.

2.5 Reacción de Maillard de la fructosa

Durante el proceso de cocción, además de la hidrólisis de los fructanos, se producen varios compuestos volátiles provenientes de la reacción de Maillard, muchos de los cuales tienen un impacto significativo en el aroma y sabor de la bebida. La reacción de Maillard resulta de la interacción entre compuestos amino, usualmente aminoácidos o proteínas y carbohidratos reductores (Bedinghaus, 1995; Shaw, 1968)

La reacción de Maillard produce oscurecimiento no enzimático, debido al ataque nucleofílico del grupo amino de un aminoácido a un grupo carbonilo de un carbohidrato (reacción de Amadori), y es seguida de una cascada de reacciones que generan compuestos volátiles (Scarpellino y Soukup, 1993).

La complejidad en los sistemas alimenticios, la presencia de diferentes azúcares reductores, aminoácidos y múltiples condiciones pueden producir una amplia variedad de los compuestos de Maillard. Un solo compuesto puede producirse por más de una vía.

En el caso de los alimentos cuya fuente de reserva de carbohidratos son los fructanos (como es el caso del *Agave* o de *Dasyliirion*) y por tanto una alta abundancia de fructosa con respecto a glucosa favorece el re-arreglo de Heyns. (Frank, 2000)

Las condiciones de cocción (~100-120 °C), bajo pH (~4.5), tiempo de cocción (~24 horas) y humedad, son altamente favorables para que se dé la reacción de Maillard en el mosto de *Dasyliirion*.

Incluso si no se alcanzan altas temperaturas, se ha mostrado que el calentamiento de inulina con asparagina, incluso a condiciones templadas, producen moléculas de Maillard de forma análoga a la fructosa (Shu, 1998).

Mancilla-Margalli y López (2002) identificaron varios compuestos de Maillard en mostos de *Agave tequilana Weber Var. azul*. a diferentes tiempos de cocción. Los cromatogramas obtenidos por GC-MS mostraron perfiles muy complejos, generalmente más de 240 compuestos en cada mosto. Los compuestos encontrados fueron ácidos, alcoholes, furanos. Seguidos de aldehídos, cetonas, compuestos aromáticos, terpenos, piranos y compuestos nitrogenados y azufrados. Los compuestos más abundantes fueron: metil-2-furoato; 2,3-dihidroxi-3,5-dihidro-6-metil-4-(H)-piran-4-ona y 5-(hidroximetil) furfural.

En otros estudios han encontrado otros compuestos como alcohol bencílico, benzaldehído, 3-hidroxi-2 butanona, lactonas y ácido acético (Apriyantono, 1993; Negroni, 2000; Benn, 1996)

Mancilla-Margalli y López (2002) también detectaron los aminoácidos que pudieron llevar a cabo la reacción de Maillard. N-acetilalanina se observó en las primeras 8 hrs de cocción. Y la presencia de compuestos heterocíclicos como pirazinas, piranonas y pirroles son evidencia de la presencia de otros aminoácidos en los tallos del *Agave*.

La presencia de compuestos sulfurados indica que los aminoácidos como cisteína y metionina también están presentes en los tallos.

Por otra parte, la cocción excesiva puede originar un sabor ahumado en la bebida, debido al aumento en la concentración de furfural en el producto final, además de reducir el rendimiento de etanol debido a la caramelización de los azúcares (Mancilla- Margarlli y López, 2002)

Debido a la gran cantidad de carbohidratos con respecto a aminoácidos o proteínas en el *Agave*, el proceso de caramelización también podría tener lugar, generando compuestos intermediarios α -dicarbonilicos. Sin embargo, la contribución de la caramelización pudiera ser insignificante, respecto a la reacción de Maillard (Hollnagel, 2000)

Estudios más profundos de los compuestos producidos por la reacción de Maillard en *Dasyilirion* en particular, aún no están descritos.

2.5.1 Productos de la reacción de Maillard que inhiben el crecimiento de levaduras

Furanos: El furfural y 5-hydroxymethylfurfural (HMF) son los inhibidores más tóxicos generados en los tratamientos térmicos. El efecto en la tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.y la subsecuente disminución de etanol en la fermentación es más alta en furfural que en HMF, pero los efectos de HMF duran más (Lewkowski, 2001).

Banerjee *et al.*, (1981) encontraron que el furfural a una concentración cercana a 1 mg/mL afecta principalmente a las enzimas deshidrogenasas lo que conlleva a una inhibición en el crecimiento y la producción de alcohol en *Saccharomyces cerevisiae*.

Banerjee *et al.*, (1981) Menciona que aún no se conoce del todo el mecanismo de inhibición del furfural. Pero sugiere que el furfural inhibe enzimas centrales de la glucólisis como la hexoquinasa, fosfofructocinasa y triosefosfato de hidrogenasa.

Por otra parte, HMF inhibe directamente la alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, esta inhibición enzimática ocurre junto con la redirección de la energía de la levadura para reparar el daño causado (Almeida, 2007).

Ácido acético: Pampulha y Loureiro (1989) y Ferrari, *et al.*, (1992) indican el importante papel de la disociación del ácido acético que se difunde en las células de las levaduras, como *Pichia stipitis*, provocando una disminución del pH en el citoplasma e inhibiendo la actividad de algunas enzimas, especialmente de la endolasa, fosfoglicomutasa, aldolasa y trisefosfato isomerasa.

Terpenos: Andrews (1980) mostró efectos indicativos de lesiones en la membrana de levaduras y otros microorganismos, debido al terpeno β -pineno.

Aldehídos: Interesantemente, varias especies de levaduras tienen la habilidad de convertir aldehídos en compuestos menos tóxicos (Liu, 2004)

Saccharomyces cerevisiae es más tolerante a inhibidores como el ácido acético, furfurales, hidroximetilfurfural (HMF) que otros microorganismos (Olsson, 1996)

2.6 LAS LEVADURAS

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco μm . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio, bajo condiciones ambientales especiales. Las levaduras pueden cambiar su metabolismo de oxidativo a fermentativo por lo que se les incluye en el grupo de los aerobios facultativos (Ochoa, 2004).

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. Su pared celular comprende entre 15 y 25 % de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90

%), esencialmente glucanos y mananos, con una menor contribución de quitina, además de proteínas y lípidos (Walker, 1998; Zinser, 1996; Rojas, 1995).

El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 y el 50 % de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales (Otero, 1995). La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5 (Chaucheyras, 1997)

Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano o GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized As Safe) (Suárez, 2016)

Las levaduras juegan un papel muy importante durante la fermentación ya que éstas son las responsables de la producción de etanol y metabolitos secundarios que le dan características sensoriales específicas a cada alimento en que se encuentra realizando una fermentación.

2.6.1 El género *Saccharomyces*

En 1938, Meyen propuso nombrar a las levaduras del pan y de la cerveza como *Saccharomyces*; el término proviene del griego sákchar σακχαρ- απος (latín *saccharum*, azúcar) y mykes μύκης (hongo). Sin embargo, fue Reess en 1870 quién define por primera vez el género, el cual pertenece a la subdivisión de los ascomicetos y a la familia *Saccharomycetaceae*. Este género ha sufrido muchos cambios taxonómicos a lo largo de los años, hasta ahora se aceptan 16 especies, las cuales están clasificadas en dos grandes grupos establecidos por Van de Walt en 1970 (Fernández-Espinar y col., 2000; Kurtzman y Robnett, 2003; Rainieri y col., 2003).

1.- *Saccharomyces sensu stricto*. En este grupo se incluyen principalmente especies asociadas a la industria de la fermentación:

- *S.bayanus*: Es capaz de fermentar a bajas temperaturas por lo que se encuentra principalmente en procesos de elaboración de vino y de la sidra.
- *S.cerevisiae*: Fermentación de vino, cerveza, cereza, pan, queso, bebidas y alimentos fermentados autóctonos, entre otros.

- *S.pastorianus*: (Sinónimo de *S.carlsbergensis*): asociada principalmente a la fermentación de la cerveza.
- *S.paradoxus*: La única de este grupo que se aísla típicamente de hábitats naturales (insectos, árboles, exudados, etc.)

2.- *Saccharomyces sensu lato*: Este grupo comprende a las especies que son más distantes de *S.cerevisiae* las cuales son: *S.barnettii*, *S.castelli*, *S.dairenensis*, *S.exigus*, *S.spencerorum*, *S.transvaalensis* y *S.unisporus*.

La diferenciación entre las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto* es una tarea difícil, pues constituye un grupo de especies estrechamente relacionadas y en algunos casos no muestra una clara separación. Los grados de homología existentes entre las especies pertenecientes a este grupo son: para *S.cerevisiae* y *S.paradoxus* de 46-59% y para *S.bayanus* y *S.pastorianus* del 70%. (Rainieri y col., 2003).

Características fisiológicas del género

Saccharomyces se caracteriza por tener células vegetativas, redondas, ovaladas o cilíndricas. Las células vegetativas son no filamentosas, predominantemente diploides o poliploides y su reproducción es por gemación multilateral. Esporula formando ascas generalmente con cuatro ascosporas en su interior.

La característica principal de *Saccharomyces* es su capacidad vigorosa de fermentar D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. La mayoría de las cepas pueden utilizar D-galactosa tanto aeróbica como anaeróticamente, pero no lactosa. Tampoco pueden utilizar nitrato como fuente de carbono, ni puede hidrolizar la urea presente en el medio (Barnett, 2004).

2.7 BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El término “fermentación” es derivado del latín “fervere”, que significa hervir; por tanto, la palabra describe la apariencia de la acción de las levaduras sobre extractos de frutas o de granos; dicha apariencia es debida a la producción de burbujas de CO₂ causada por el catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en el extracto. Sin embargo, la fermentación ha tener diferentes significados en los procesos microbiológicos industriales y bioquímicos. Su significado bioquímico relaciona la generación de energía por el

catabolismo de compuestos orgánicos, mientras que el significado en microbiología industrial es más amplio.

Desde un contexto bioquímico, el catabolismo de los azúcares es un proceso oxidativo que resulta en la producción de nucleótidos de piridina reducidos, los cuales deben ser reoxidados por procesos subsecuentes.

Bajo condiciones aeróbicas, la reoxidación de nucleótidos de piridina ocurre por transferencia de electrones; vía el sistema citocromo, con el oxígeno actuando como aceptor final de electrones. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas, la reoxidación de los nucleótidos de piridina reducidos está acoplada a la reducción de un compuesto orgánico, el cual es un producto subsecuente de la vía catabólica.

En el caso de la acción de las levaduras sobre las frutas o extractos de granos, el NAD^+ es regenerado por la reducción del ácido pirúvico a etanol; entonces, el término fermentación ha sido usado en sentido bioquímico estricto para definir el proceso de generación de energía en donde un compuesto orgánico actúa como donador y aceptor final de electrones.

La microbiología industrial extiende el término fermentación para describir cualquier proceso para la generación de un producto por la masa de un microorganismo cultivado

(Verdugo Valdez, 2013)

2.7.1 Etanol

La producción de alcohol por la acción de levaduras se lleva a cabo a gran escala desde hace muchos años.

Por ejemplo, en la producción de mezcal, durante la fermentación, los microorganismos utilizan los azúcares y otros compuestos del jugo de Agave, como sustrato para su crecimiento, transformándolos en etanol, dióxido de carbono, alcoholes superiores y esteroides, entre otros compuestos metabólicos que en conjunto determinan las características organolépticas del producto final (Escalante-Minakata et al. 2006)

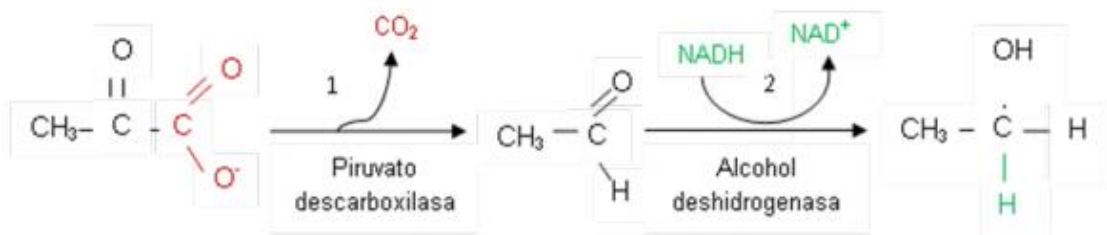
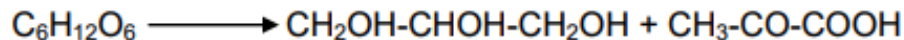


Figura 17. Síntesis de etanol a partir del piruvato (Voet et al.1999) (Verdugo, 2013)

En la Fig. 17 se presentan las dos reacciones consecutivas para la síntesis de etanol en las levaduras. En la reacción 1 se lleva a cabo la descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y CO_2 por acción de la piruvato descarboxilasa que utiliza como cofactor al pirofosfato de tiamina (TPP). En la reacción 2 ocurre la reducción del acetaldehído a etanol, por NADH por efecto de la enzima alcohol deshidrogenasa, regenerándose NAD^+ para su utilización en la glucólisis por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Voet et al. 1999).

Sin embargo, no hay fermentación alcohólica pura, debido a que no todas las moléculas de azúcar siguen la ecuación de Gay-Lussac, porque en cierta proporción, son degradadas por la fermentación gliceropirúvica según la ecuación de Neuberg:



En esta reacción, se genera glicerol y ácido pirúvico; que eventualmente es descarboxilado a acetaldehído y no reducido a etanol; de tal forma que esta es la vía de generación de diversos productos secundarios que se obtienen en anaerobiosis, tales como el ácido acético, ácido succínico, acetyl metil carbinol, 2-3-butanodiol y etanal (Usseglio-Tomasset, 1995).

Las fermentaciones alcohólicas realizadas de forma natural no son debidas a la acción de una única especie ni de una única cepa de levadura, sino que es el resultado de la acción combinada de diversas especies de levaduras que crecen en mayor o menor cantidad (Ribéreau, et al 1975).

2.8 PLANTAS Y MICROORGANISMOS QUE SE HAN REPORTADO EN LA PRODUCCIÓN DE SOTOL Y EN BEBIDAS PARECIDAS.

Tabla 5. Tipos de *Agaves* empleados y microorganismos reportados en Mezcal (Lappe y col., 2008) (Cova, 2010)

Mezcal	
Tipo de bebida	Destilada
Especie de <i>Agave</i>/ Estado de Producción	<i>A.salmiana</i> San Luis Potosí <i>A.cupreata</i> Michoacán <i>A.inaeuidens</i> <i>A.angustifolia</i> <i>A.americana var. Oaxacensis</i> <i>A. karkwinkii</i> Oaxaca <i>A.marmorata</i> <i>A.potatorum</i> <i>A.duranguensis</i> Durango <i>A.fourcroydes</i> Yucatán
Substrato	Mosto
Microbiota funcional	Bacterias: <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>L.kefir</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.farraginis</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>W.paramesenteroides</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> . Levaduras: no-Saccharomyces (<i>Candida spp.</i> <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debrayomyces hansenii</i> , <i>Hanseniaspora spp</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia caribbica</i> , <i>P.guilliermondii</i> , <i>T.delbrueckii</i>) Saccharomyces (<i>S.cerevisiae</i>)

Tabla 6. Tipos de *Agaves* empleados y microorganismo reportados en Tequila (Lappe y col., 2008) (Cova, 2010)

Tequila	
Tipo de bebida	Destilada
Especie de <i>Agave</i>/ Estado de Producción	<i>A.tequilana weber var. azul</i> Jalisco y regiones de los estados de: Nayarit, Michoacán, Tamaulipas y Guanajuato.
Substrato	Mosto
Microbiota funcional	<u>Fermentación natural:</u> Bacterias ácido lácticas (BAL)

	<p>Levaduras: no-Saccharomyces (<i>Candida spp.</i>, <i>C.magnolia</i>, <i>Hanseniaspora guillermondii</i>, <i>H.uvarum</i>, <i>H.vinae</i>, <i>Kmarxianus</i>, <i>P.membranifaciens</i>, <i>T.delbrueckii</i>) y Saccharomyces (<i>S.cerevisiae</i>)</p> <p><u>Fermentación industrializada:</u> El cultivo iniciador proviene de cepas de <i>S.cerevisiae</i></p>
--	---

Tabla 7. Tipos de *Agaves* empleados y microorganismo reportados en Bacanora (Álvarez y col., 2009)

Bacanora	
Tipo de bebida	Destilada
Especie de Agave/ Estado de Producción	<i>A.angustifolia</i> Sonora
Substrato	Mosto
Microbiota funcional	<i>Saccharomyces (S.cerevisiae)</i> no- <i>Saccharomyces (Brettanomyces abstinens, Pichia guillermondii, Kluyveromyces marxianus, Metschnikowia reukafii, Candida blankii, Candida silvatica, Hansenula polymorpha, Pichia farinose, y Rhodotorula)</i>

Tabla 8. Tipos de *Dasyilirion* empleados y microorganismo reportados en Sotol (De La Garza, 2000)

Sotol	
Tipo de bebida	Destilada
Especie de Agave/ Estado de Producción	<i>Dasyilirion duranguense</i> <i>Dasyilirion cedrosanum</i> <i>Dasyilirion wheeleri</i>
Substrato	Mosto
Microbiota funcional	Levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae, Candida glabrata, Candida kefir</i> Bacterias: <i>Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Acetobacter sp, Bacillus deiformis</i>

2.9 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

2.9.1 Métodos basados en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

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

- 1) Pruebas morfológicas: Tal como es el aspecto de la colonia, la morfología del estado sexual y asexual, la presencia de homo y heterotalismo, entre otras.
- 2) Pruebas fisiológicas: Como la asimilación y fermentación de diversas fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, termotolerancia, resistencia a cicloheximida.
- 3) Pruebas bioquímicas: Análisis total de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas y de Resonancia Magnética Nuclear y la cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular.

La identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de unas 100 pruebas y sólo permiten la identificación hasta el nivel de género. Las principales desventajas que han mostrado las pruebas morfológicas se manifestaron con el descubrimiento del estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme de los ascomicetes y basidiomicetes, o sea, la relación anamorfo/telomorfo, lo cual ha generado que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (telomorfo). Es decir, estas pruebas varían dependiendo de las condiciones de cultivo.

Por otra parte, las pruebas fisiológicas no siempre son estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes. La prueba de fermentación de azúcares no es muy exacta debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata para que sea atrapado en un tubo de Durham.

Y por último, las pruebas bioquímicas dependen del estado fisiológico de las cepas. (Fernández-Espinar y col., 2006; Orberá, 2004)

2.9.2 Métodos moleculares para la identificación de levaduras

Por lo descrito anteriormente, se ha optado por complementar esta identificación con técnicas moleculares, que se basan en el estudio de la semejanza o disimilitud del DNA, RNA o proteínas. Éstas permiten analizar el genoma independientemente del estado fisiológico de la levadura, dejando en segundo plano el análisis de rasgos fenotípicos.

Estas incluyen: Patrones de alozimas, hibridación del DNA-DNA, electroforesis de cariotipo, análisis de microsatélites, PCR anidado, análisis aleatorio de ADN polimórfico amplificado (RAPD), RFLP de ADN cromosómico y RFLP del DNA mitocondrial (mtDNA). (Esteve-Zaroso y col.1999)

Análisis de las regiones ribosomales

Las regiones ribosomales de las levaduras (5S, 5.8S, 18S y 26S) están agrupados formando unidades transcripcionales que se repiten de 100 a 200 veces en el genoma. En cada unidad se encuentran regiones espaciadoras:

- a) Espaciadores internos transcritos (ITS1, ITS2)
- b) Espaciadores externos transcritos (ETS)
- c) Espaciadores no transcritos (NTS) los cuales separan a las unidades codificantes (Figura 18)

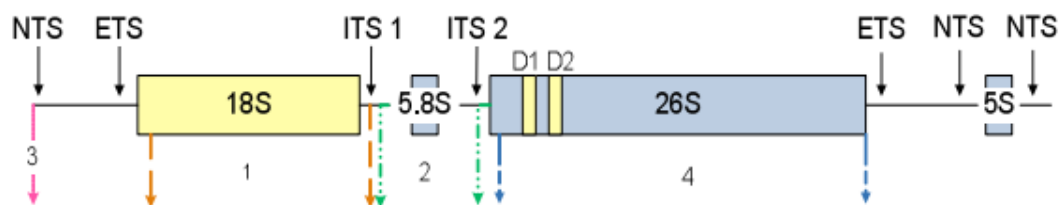


Figura 18. Estructura del ADN ribosomal nuclear de levaduras (Fernández-Espinar y col., 2006)

Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S, así como las regiones ITS y NTS han sido ampliamente utilizadas en estudios de identificación y filogenia de levaduras, debido a la presencia de secuencias conservadas y de su concertada evolución, ya que los cambios marcan diferencias evolutivas. Debido a que las regiones ribosomales evolucionan, muestran

un polimorfismo intraespecífico bajo y una alta variabilidad intraespecífica, se ha probado como una forma útil para la clasificación de especies del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y levaduras del vino. Estudios han demostrado que el complejo ITS (espaciador interno transcrito), regiones (no codificante y variable) y el gen 5.8S r RNA (codificado y conservado) son útiles para medir las relaciones estrechas genealógicas de hongos, ya que muestran diferencias interespecíficas mucho mayores que los genes 18S y el 26S r RNA (Esteve-Zarzoso y col.1999).

A continuación, se describen algunos de los métodos basados en estas regiones ribosomales.

Análisis de restricción de regiones ribosomales

El más amplio uso que se le ha dado a la técnica de RFLP ha sido utilizando la región del rDNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2.

La región 5.8S es codificadora y conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie, sin embargo la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico. En estos estudios se ha utilizado una variante de la técnica conocida como RFLP-PCR. Para ella, se amplifican fragmentos específicos del DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis. Los productos de la PCR del rDNA muestran elevada variación longitudinal para las diferentes especies. El tamaño de los productos de la PCR y el análisis de restricción de esta región con las endonucleasas *HinfI*, *CfoI* y *HaeIII* que genera un patrón especie-específico, excepto para los pares anomorfo/telomorfo y las especies muy similares como las del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, no presentan diferencias. (Orberá, 2004).

En particular, el análisis de restricción de la región ITS-5.8S permite identificar a distintas especies de levaduras, Esteve-Zarzoso y col. (1999) identificaron a 191 especies de levaduras) debido a que la región 5.8S es conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica además de ser codificadora; mientras que los ITS son regiones

hipervariables y no codificadoras. Por lo tanto las secuencias más conservadas (5.8 S) son útiles para la clasificación de altos niveles taxonómicos (por ejemplo género), mientras que las regiones hipervariables (ITS) son utilizadas a nivel de especie y sub-especie (Figura 19). El uso de las enzimas *CfoI*, *Hae III* y *Hinf I* genera un patrón especie-específico útil para identificar un gran número de levaduras; sin embargo en especies que son muy cercanas las diferencias no son muy notables, tal es el caso del grupo de levaduras *Saccharomyces sensu stricto* al cual pertenece *S.cerevisiae* (Esteve-Zarzoso y col., 1999; Orberá, 2004).

Otras regiones ribosomales que se amplifican y después se tratan con enzimas de restricción son:

1.- 18 S-ITS 1: Utilizando las enzimas *AluI*, *HaeIII*, *MspI* y *RsaI* se pueden identificar hasta 128 especies de levaduras. (Dlauch y col., 1999)

2.- NTS, NTS-18S, y NTS-ITS: El análisis por PCR-RFLP de estas regiones permite identificar a las especies del género de *Saccharomyces sensu stricto* (Fernández-Espinar y col., 2006).

Secuenciación de regiones ribosomales

Las regiones comúnmente utilizadas son: una región del gen ribosomal 18S y los dominios D1 y D2 de alguna región del gen ribosomal 26S, indicados en la Figura 19.

Los métodos de secuenciación empleados son el método Sanger, la pirosecuenciación y principalmente la secuenciación masiva.

Se determinan y comparan las secuencias de estas regiones con la secuencia de especies conocidas utilizando bases de datos (WU-BLAST). La disponibilidad de las secuencias de los dominios D1/D2 e ITS1/ITS4 en bases de datos, hacen de estos una muy buena opción para la identificación de levaduras; se ha reportado que cuando el porcentaje de homología de estas secuencias es mayor o similar al 99% permite la asignación de especie a levaduras desconocidas (Kurtzman y Robnett, 1998).

3. HIPÓTESIS

Debido a las condiciones del proceso de fermentación natural para la producción de Sotol en una región de Aldama, Chihuahua; a lo reportado en fermentaciones similares y a las características del producto final; se esperaría encontrar que la fermentación se lleva a cabo predominantemente por especies del género *no-Saccharomyces*.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general:

Establecer cuáles son los géneros de levaduras que se encuentran presentes en las distintas etapas de una fermentación de Sotol de una región de Aldama, Chihuahua.

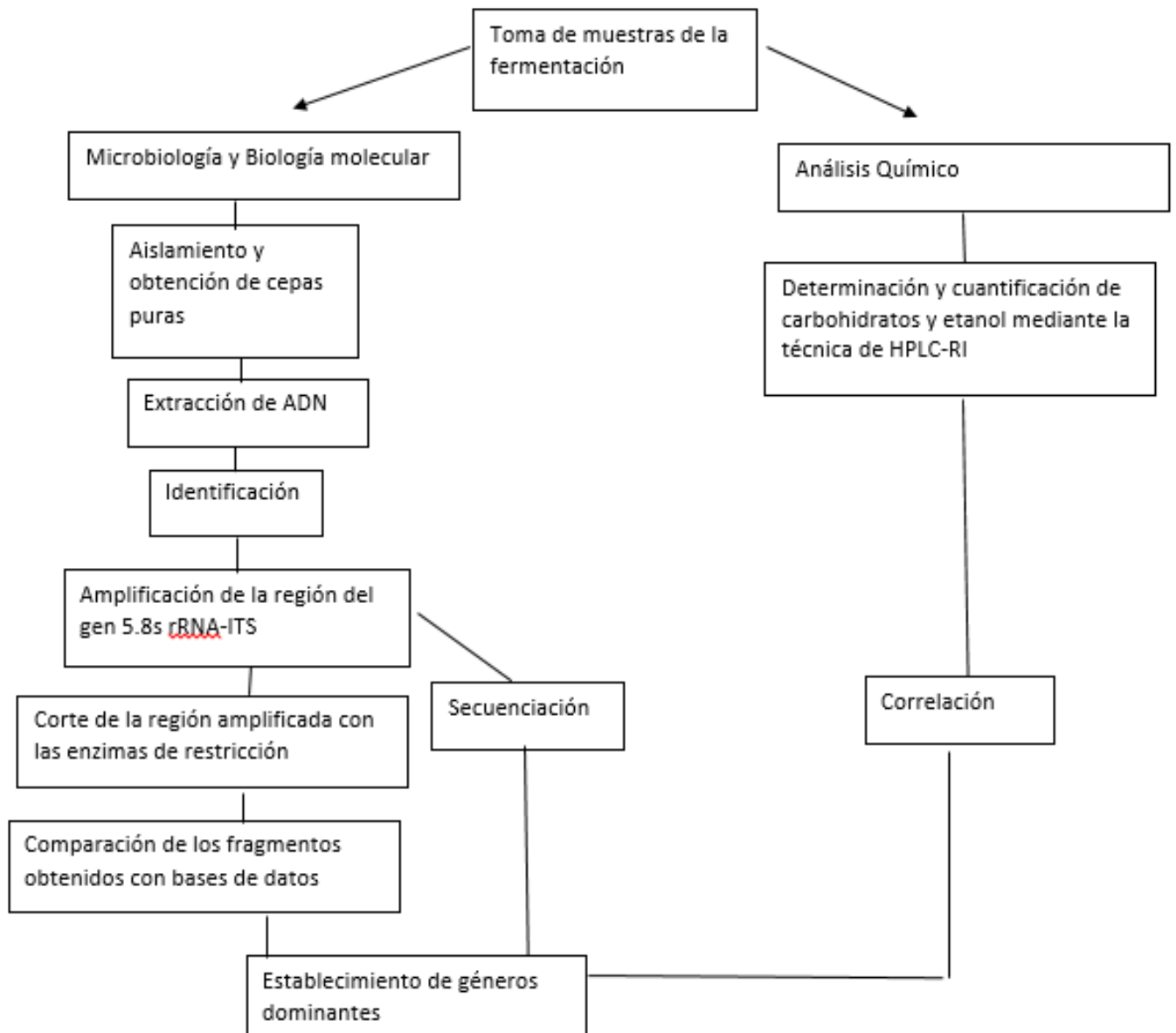
4.2 Objetivos particulares:

- Establecer si hay algún género de levadura que predomine durante toda la fermentación.
- Determinar la sucesión de las levaduras presentes durante la fermentación del mosto de Sotol.
- Determinar la eficiencia de la fermentación alcohólica en términos de la producción de etanol.

5. JUSTIFICACIÓN

El propósito de este trabajo es complementar y describir el estudio sobre de la diversidad de levaduras que están participando en la fermentación para la producción de Sotol y entender cuáles son las características particulares del proceso del Sotol que se produce en la región de Aldama, Chihuahua.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Esquema 1. Estrategia experimental

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Toma de muestra

Se recolectaron muestras de mosto de Sotol provenientes de un lote de producción de 800 L, a lo largo de los diferentes tiempos de fermentación, tomadas de la sotolería, "Coyamito". Ubicada en la región de Coyame, en el municipio de Aldama. Mostradas en la Figura 20.

Se tomaron por duplicado aproximadamente 35 mL de mosto en tubos Falcon de 50 mL y se les agregaron 15 mL de glicerol (Sigma), para tener muestras con 30% de glicerol y así poderlas conservar posteriormente en congelación.

Esto se realizó cada 24 horas durante cinco días. Se transportaron en hieleras hasta la Universidad Autónoma de Chihuahua y se almacenaron a 4°C, posteriormente, se transportaron en hieleras hasta la Ciudad de México al Laboratorio 321 del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM. Dónde se almacenaron a -20°C.



Figura 19. Mapa de Chihuahua, en donde se enmarca a Coyame y Aldama (Chihuahua Turismo, s.f.).

7.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS MOSTOS DE SOTOL A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN.

7.2.1 Determinación de sólidos solubles (°Bx) de los mostos

Se utilizó un refractómetro (Atago ATC-1 Brix 0~32%).

Se tomaron 1.5 mL del mosto de Sotol en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y se colocó una gota del sobrenadante en el prisma del refractómetro, esta medición se realizó por triplicado.

7.2.2 Medición del pH en las muestras de mosto de *Dasyliirion*.

Se determinó con un potenciómetro (Jenway 3020) de la siguiente manera: Se tomaron 30 mL de muestra y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL, se colocó un agitador magnético de 1 cm y se homogenizó la muestra durante 1 min; se introdujo el electrodo del potenciómetro y se estabilizó durante 2 min; se tomó la lectura, todas las lecturas se tomaron por triplicado.

7.2.3 Determinación de la acidez en las muestras de mosto de *Dasyliirion*

Se tomaron 10 mL de las muestras, se introdujo el agitador magnético y se agregó NaOH 0.01 M hasta la neutralidad, se tomaron las lecturas de los mililitros gastados de NaOH. El análisis se realizó por duplicado. El ejemplo de cálculo para determinar la acidez en g/L de ácido acético se muestra en el Anexo I.

7.2.4 Determinación y cuantificación de carbohidrato y etanol presentes en los distintos tiempos de fermentación de las muestras de mosto de Sotol mediante HPLC-RI.

El volumen de inyección fue 10 µL. Se utilizó un cromatógrafo (Waters 525) acoplado a un detector de índice de refracción (LC-30RI, Perkin Elmer), para la detección de fructosa y etanol se usó una columna (Aminex HP-87X Bio-Rad) la temperatura del horno fue de 50 °C, para la fase estacionaria. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 4 mM a un flujo de 0.6 mL/min.

Para el caso de la inulina y los fructooligosacaridos una columna (Sugar Pak I (Waters), la temperatura del horno fue de 70 °C, para la fase estacionaria. La fase móvil utilizada fue EDTA- Ca (Sigma) 0.0001 M a 80°C a un flujo de 0.4 mL/min.

Se determinó la presencia de los carbohidratos a partir del tiempo de retención en la columna y se compararon con los estándares los cuales se corrieron sobre fase móvil y con el tiempo de retención se determinó la identidad de los picos del cromatograma, es decir, se usó un método de estándar externo, a partir de curvas de calibración.

Los cromatogramas se observaron en el programa Empower y para el análisis de datos se usaron los programas Excel 2010.

7.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS MOSTOS A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN.

7.3.1 Siembra de los mostos y observación de las levaduras

Se hicieron diluciones decimales de los mostos recolectados a lo largo de la fermentación en agua peptonada al 0.1% (Sigma) y se sembraron por dispersión en placa en medio YEA: Agar extracto de levadura y peptona con estreptomycinina y cloranfenicol (Difco).

Se incubaron a 30 °C durante 48 h, en una incubadora marca Riossa. Se observaron las características macroscópicas y microscópicas (microscopio marca Zeizz) de las levaduras y se describieron.

7.3.2 Conteo de las cajas sembradas y conservación de las colonias seleccionadas

Para el conteo, se seleccionaron las cajas con un número mayor a 30 y menor o igual a 300 colonias.

Para aislar, se hizo agotamiento en placa en medio YEA, se escogieron 5 colonias de cada una de las morfologías diferentes. En algunos casos se utilizó medio WLN: Wallenstein nutritivo (Difco) para corroborar la morfología de la colonia.

Posteriormente se guardaron cinco colonias de cada una de las morfologías diferentes con 0.7mL de YPD líquido y 0.3 mL de glicerol (Sigma) en tubos Ependorff, se congelaron a -80°C.

7.3.3 Extracción de ADN de las cepas aisladas de los mostos.

A partir de las colonias que se guardaron en ultracongelación se inocularon tubos con medio YPD líquido y éstos se incubaron a 30 °C por 72 horas, se tomó 1 mL del medio y se colocó en tubos Eppendorf, se centrifugaron a 14, 000 rpm por 10 min en una microcentrifuga (5417R Eppendorf). Se desechó el sobrenadante (se repitió este paso hasta obtener un pellet) y se congelaron a -20 °C durante 24 horas. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 0.5 mL de agua desionizada estéril y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, se agregaron 200 µL de amortiguador de lisis (2% tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 Mm Tris (pH 8), 1mM EDTA Sigma) y se resuspendió. Se agregaron 0.3 g de perlas de vidrio estériles, 200 µL de disolución PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamilico, 25:24:1, saturado con 10 mM de Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA Sigma) se agitó en un disruptor de células (Disruptor Genie SI-D236) por 90 s, se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 min a 4°C, se tomaron únicamente 80 µL del sobrenadante acuoso recuperado, se depositaron en un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 500 µL de etanol 100% a -20°C, se mezcló por inversión y se congeló a -20 °C durante 30 minutos. Se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante, los tubos se dejaron boca abajo encima de un papel absorbente durante 30 segundos. Se resuspendió en amortiguador TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) y se agregó 3 µL de disolución de RNAsa (Sigma) y se incubó a 37°C por 5min (incubadora marca Riossa).

Se agregaron 160 µL de etanol al 100% a -20°C y se congelar a -20°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se dejaron secar los tubos por 24 horas y se resuspendieron en 50 µL de amortiguador TE.

Una vez extraído el ADN se procedió a observar las muestras extraídas en un gel de agarosa al 1% Sigma (0.4 g de agarosa en 40 mL de amortiguador TBE 0.5 X, 4 µL de Syber Safe, 1 µL de amortiguador de carga y 2 µL de cada muestra) por medio de una electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) durante 30 minutos a 100 V, utilizando amortiguador TBE 0.5 X. Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas utilizando el programa Image Lab 3.0, según la

presencia, integridad e intensidad de la banda del ADN extraído se procedió a realizar la cuantificación del ADN (Hoffman, 1987).

7.3.4 Cuantificación del ADN. Método espectrofotométrico

Para determinar la pureza y la concentración de ADN se cuantificó la absorbancia a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. Se utilizaron 2 μ L de muestra y se cuantificó en el lector de microplacas Epoch (Biotek) utilizando el software Gen 5 1.10.

La relación de las absorbancias $[A_{260}/A_{280}]$ permite estimar el grado de pureza del ADN; en el caso de preparaciones puras de ADN la razón de esta relación debe ser entre 1.8 y 2.0. Un cociente menor de 1.8 indica contaminación con proteínas en cuyo caso es recomendable volver a precipitar el ADN; por el contrario un cociente mayor a 2.0 indica que la muestra podría estar contaminada con cloroformo y en este caso se debe re-precipitar nuevamente con etanol (Gallagher, 1998).

La concentración de ADN se calculó a partir de la ecuación de Lambert –Beer: $(A_{260})=\epsilon C\lambda$; despejando la concentración tenemos: $C=(A_{260})/\epsilon$

Donde:

A_{260} : Absorbancia a 260 nm.

ϵ : Coeficiente de extinción molar $1/50= 0.02$

C: Concentración $[ADN \mu g/mL]$

λ : espesor de la celda=1

7.3.5 Amplificación de la región 5.8 s rRNA-ITS.

Para identificar a las cepas aisladas se utilizó el método de PCR-RFP de la región: ITS1-5.8S-ITS2 (Esteve-Zarzoso y col., 1999)

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, empleando un termociclador Applied Biosystems Veriti, utilizando los siguientes reactivos:

Agua desionizada estéril (la necesaria para aforar el volumen de reacción), 10x amortiguador Taq (Invitrogen), $MgCl_2$ 25 mM (Invitrogen), mezcla de dNTP's 2 mM de cada uno (Invitrogen), 0.5 μ M de cebador ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3')

(Invitrogen), 0.5 μ M de cebador ITS-4 (5' TCCGTCCGCTTATTGATATGC3') (Invitrogen), enzima Taq polimerasa recombinante 1.25 U (Invitrogen) y ADN templado (~ 50 ng/ μ L). El volumen final de la reacción fue de 50 μ L.

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización (1 ciclo, 95°C/5 min), Amplificación (35 ciclos, desnaturalización 94°C/1 min. Alineamiento 55.5°C/2 min, amplificación 72°C/2 min) y extracción final (1 ciclo 72°C/10min). (Esteve-Zarzoso y col., 1999).

El producto de la amplificación se separó por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) en gel de agarosa al 1% con amortiguador TBE 0.5 x a 100 V durante 30 minutos, utilizando un marcador de peso molecular de 1kb (Plus ADN Ladder Invitrogen). Como revelador se utilizó Syber Safe (Invitrogen). Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador (Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Image Lab 3.0.

7.3.6 Análisis de restricción de los amplicones

Los productos obtenidos de la reacción de PCR, fueron cortados con las enzimas de restricción: *Hae III*, *Hinf I* y *CfoI*, (Invitrogen)

Se preparó una mezcla de reacción con 7 μ L de agua desionizada esteril, 2 μ L de amortiguador "Red" Anza 10X, 10 μ L de DNA y 1 μ L de la enzima. Se incubó a 37°C por 30 minutos en un baño María (Oakton).

Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis (Pharmacia Biotech GNA 100) a 100 V durante 30 minutos en gel de agarosa al 2% utilizando amortiguador TBE 0.5 X y un marcador de tamaño molecular de 1Kb (Plus ADN Ladder Invitrogen). Como revelador se utilizó Syber Safe (Invitrogen). Los frgamentos de restricción se observaron en un fotodocumentador (Bio-Rad) y las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa Image Lab 3.0.

7.3.7 Identificación con banco de datos

Se buscó y comparó en la base de datos de yeast-id (actualizada por última vez el 16 de Octubre del 2015) y la base de datos reportada por Esteve-Zarzoso y col., 1999.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS MOSTOS DE SOTOL A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

8.1.1 Determinación de los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) en los mostos de Sotol

La medición de los $^{\circ}\text{Bx}$ sirven para determinar el cociente total de sólidos (generalmente azúcares) disueltos en un líquido. El principio de medición se basa en la refracción de la luz creada por la concentración de los solutos (Boulton et al., 1996).

En el proceso para la producción de Sotol se utiliza esta medición para predecir el avance de la fermentación.

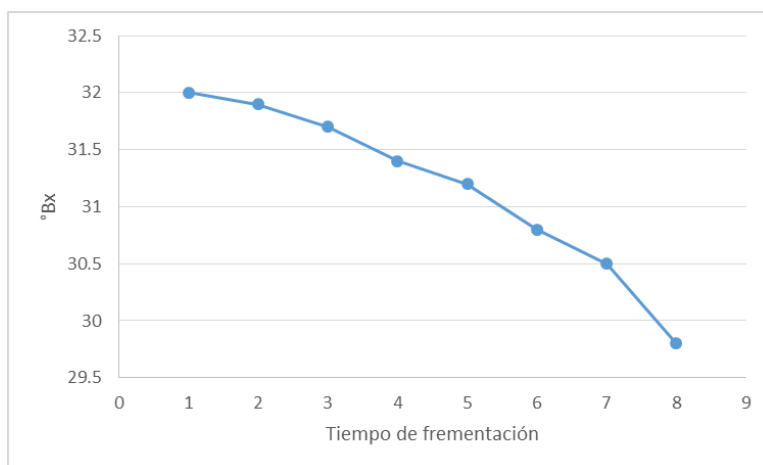
Para la fermentación estudiada se obtuvo que el promedio de los grados Brix iniciales fue de 32°Bx y se observó un decremento hasta los 29°Bx . Como se observa en la Gráfica 1. Nielsen (2003) propone que esta disminución en los $^{\circ}\text{Bx}$ se asocia a la alta demanda de sustrato por parte del crecimiento exponencial que están experimentando las levaduras en este periodo. Del mismo modo menciona que la estabilización en la variación de este parámetro hacia el final del proceso, se asocia al momento final del ciclo de las levaduras, en el que cesa su actividad de transformación de azúcares.

El contenido de sólidos solubles es superior a lo descrito en Sotol. De la Garza (2000) reporta un valor menor a 12°Bx , por otra parte, en ensayos de fermentaciones de *Agave* realizadas por Andrade (2006) reportó un cambio en los sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) de 17 hasta 6°Bx .

El que se obtuviera un mayor valor de $^{\circ}\text{Bx}$ a lo reportado puede deberse a la presencia de otros compuestos solubles presentes en el mosto como el glicerol, el etanol, la presencia de polisacáridos (como amilopectinas, pectinas, gomas, mucílagos, fructanos), oligómeros y polímeros con distintos grados de polimerización (como la inulina), otros monosacáridos distintos a la fructosa (xilosa y glucosa), productos de la reacción de Maillard (furfurales, cetonas, éstres), ácidos orgánicos, proteínas y minerales.

Nielsen (2008) y Southgate (1991) mencionan que estos compuestos al ser solubles en agua contribuyen a la lectura refractométrica de los sólidos solubles. Boulton *et al.*, (1996) mencionan que cuanto mayor concentración de sólidos solubles presente un mosto, mayor será su densidad y menor la velocidad de los rayos de luz que lo atraviesen, que al mismo

tiempo sufrirán una desviación en su trayectoria. Esta desviación de trayectoria está directamente relacionada con la concentración de azúcares y otros sólidos solubles, de forma que cuanto mayor sea su concentración, mayor será el grado de desviación del haz de luz incidente y viceversa.



Gráfica 1.- °Bx a lo largo de la fermentación.

8.1.2 Medición de pH y determinación de la acidez en los mostos de Sotol.

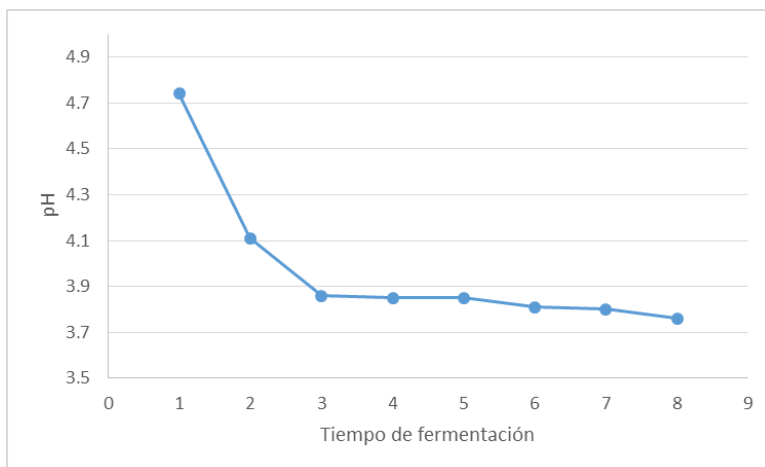
La medición del pH al inicio de la fermentación se encontró en 4.8 Y al final de la fermentación disminuyó a 3.8. Como se muestra en la Gráfica 2.

En cambio la acidez aumenta, como se observa en la Gráfica 3.

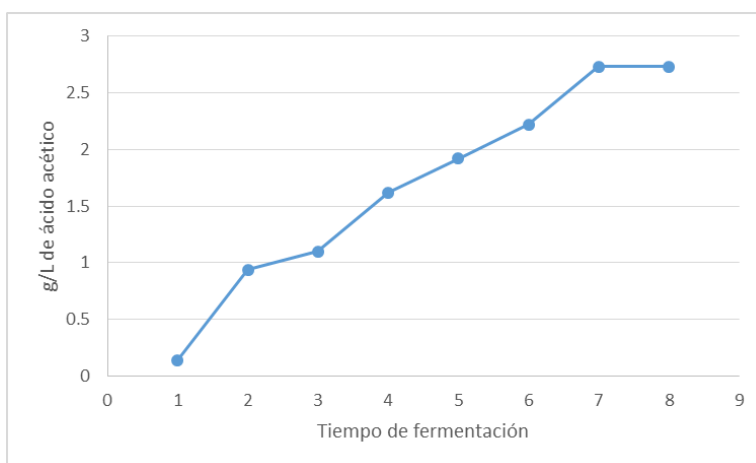
El pH cambió durante la fermentación y también se ve reflejado en el cambio de acidez.

En *Agave* se reportó que los cambios de pH y acidez se deben a la presencia de ácidos orgánicos como el ácido acético generado por la fermentación acética de las bacterias *Acetobacter* a través del metabolismo de etanol a acetaldehído y ácido acético y en menor medida de levaduras y también se puede deber a la presencia de ácido láctico proveniente del metabolismo de bacterias lácticas (Andrade, 2006).

Estos valores coinciden con los reportados para otras fermentaciones alcohólicas en condiciones similares, para el caso del Mezcal, Andrade (2006) encontró valores entre 4.47 a 4.15. Para el Tequila, Cedeño (1999) menciona valores entre 4.5 a 3.9.



Gráfica 2.- Cambio de pH de los mostos lo largo de la fermentación.



Gráfica 3. Determinación de la acidez de los mostos.

8.1.3 Determinación y cuantificación de carbohidratos y etanol presentes en los distintos tiempos de fermentación de las muestras de mosto de Sotol mediante la técnica de HPLC-RI

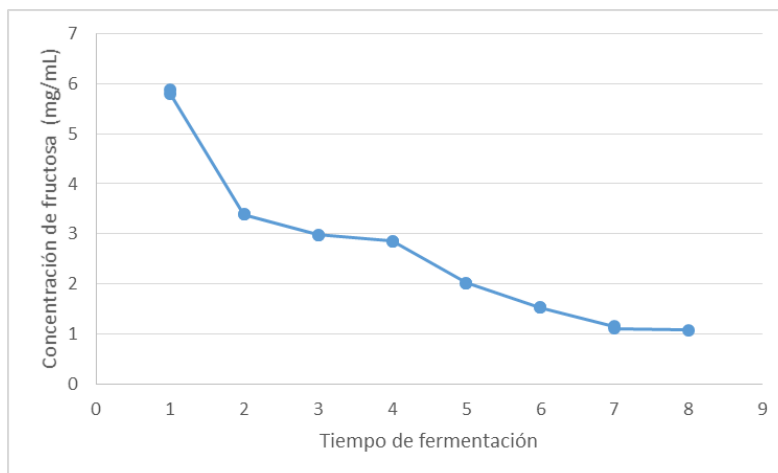
- Consumo de fructosa a lo largo de la fermentación

El promedio de la concentración de fructosa de dos repeticiones tomadas de la misma fermentación en un mismo tanque al inicio con 5.88 mg/mL de fructosa y terminó en 1.08 mg/mL de fructosa, datos mostrados en la (Gráfica 4).

Por lo tanto, el porcentaje del consumo de fructosa es del 81.64% (Cálculo en el Anexo, PARTE I)

Cruz *et al.*, (2013) reporta en una fermentación de *Agave* el porcentaje de consumo de fructosa fue del 89.46%.

Sin embargo, la concectración inicial de fructosa es baja en compración a la reportada en procesos similares como en Mezcal Andrade (2006) reporta que fue de 7.6%



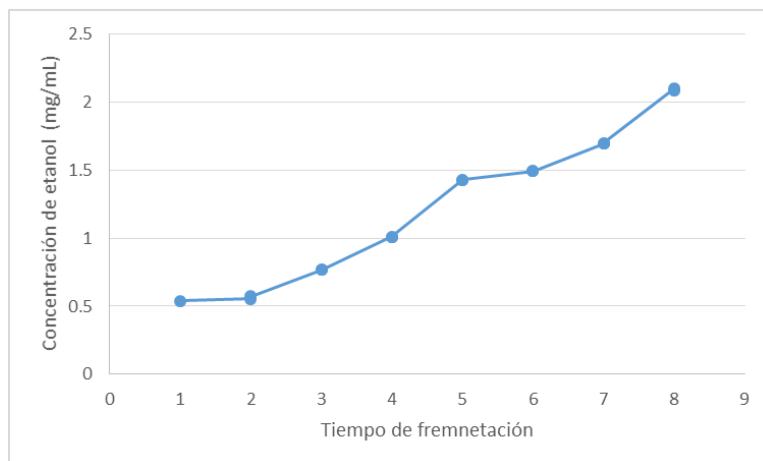
Gráfica 4. Promedio de la concentración de fructosa de dos repeticiones tomadas de la misma fermentación en un mismo tanque.

- Producción de etanol durante la fermentación

El promedio de la concentración de etanol de dos repeticiones tomadas de la misma fermentación en un mismo tanque inició con una concentración de 0.54 mg/mL de etanol, lo que confirma que la fermentación inició antes de llevar las piñas cocidas a los recipientes de fermentación. El promedio de la concentración final de etanol fue de 2.48 mg/mL. Con esto se puede observar que no toda la fructosa se convirtió en etanol.

La concentración final de etanol es baja en comparación a la reportada en bebidas similares, en Mezcal, por ejemplo, (Andrade, 2006) reporta una concentración de 6.51 mg/mL.

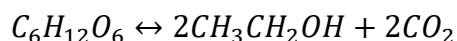
Hay quienes han reportado en *Agave* Andrade (2006) y Cedeño (1999) que las concentraciones bajas de etanol se deben al hecho de que la fermentación es abierta y esto ocasiona pérdidas por evaporación, asimismo que al tratarse de condiciones no asépticas, la actividad bacteriana puede incrementar, en cuyo caso las bacterias usan el azúcar, disminuyendo la concentración de etanol final producida y en algunos casos excretando compuestos indeseables, a un ineficiente proceso de cocción de los tallos lo que da una baja concentración de fructosa y finalmente a que no se cuenta con microorganismos que consuman eficientemente la fructosa como *Saccharomyces cerevisiae*.



Gráfica 5. Promedio de la concentración de etanol de dos repeticiones tomadas del mismo tanque de fermentación.

8.1.4 Rendimiento de la fermentación

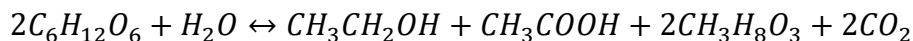
La fermentación alcohólica genera principalmente alcoholes a partir de azúcares presentes en el mosto; de estos alcoholes, el etanol es el mayoritario y representa un 95% del contenido total (Enríquez, 2016) teniendo esto en mente y con base en la expresión estequiométrica simplificada de la fermentación alcohólica, descrita por Gay Lussac, Ribéreau (2006) se hizo una aproximación del proceso.



La concentración inicial de fructosa fue de 5.98 mg/mL, la concentración final de etanol fue de 2.08 mg/mL, por lo que el rendimiento de esta fermentación fue del 69.5% (Cálculo en el anexo, PARTE I).

En otras fermentaciones similares, como la de Hidromiel (Acosta, 2012) reporta que el proceso fermentativo alcanza un rendimiento del 87-93%. En una fermentación de *Agave cocui* Leal *et al* (2014) obtuvieron un porcentaje de rendimiento de 81,5%, Sin embargo, hay otros parámetros que no se están considerando:

Por ejemplo, Austin (1990) presenta la siguiente ecuación para explicar lo que ocurre en el proceso fermentativo, en donde no sólo se forma etanol, también se produce ácido acético, glicerol y dióxido de carbono.

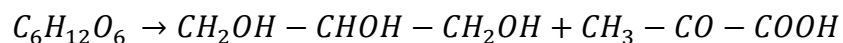


fructosa + agua \leftrightarrow *etanol + ácido acético + glicerol + dióxido de carbono*

Por otra parte, (Owen *et al.*, 1989) reporta que aproximadamente el 10% de la glucosa o fructosa es convertida en biomasa.

De León-Rodríguez (2008) argumenta que las células de levadura también producen una amplia gama de metabolitos secundarios como ésteres, aldehídos y alcoholes.

Usseglio-Tomasset (1995) menciona que en cierta proporción, las moléculas de azúcar son degradadas por la fermentación gliceropirúvica según la ecuación de Neuberg:



En esta reacción, se genera glicerol y ácido pirúvico; que eventualmente es descarboxilado a acetaldehído y no reducido a etanol y esta es la vía de generación de diversos productos secundarios, como el ácido acético, ácido succínico, acetil metil carbinol, 2-3-butanodiol y etanal.

Esto también dependerá de las condiciones del microorganismo dentro del sistema, condiciones aerobias o anaerbias. Condiciones aerobias se va a ir más hacia biomasa.

Condiciones anaerobias pudiera que se vaya más a etanol y otros compuestos (Usseglio-Tomasset, 1995).

En este caso, la fermentación sería mixta, con mayor tendencia a la anerobiosis ya que los tanques de fermentación están abiertos, pero recubiertos con bagazo; pudiera estar pasando que los microorganismos que estén arriba (cerca de la cobertura de bagazo) sean aerobios y los de abajo anaerobios.

Por otra parte. Para incrementar el rendimiento de la fermentación, en otras fermentaciones de *Agave* se ha sugerido el uso un complejo enzimático (exoinulinasas) para convertir los polímeros residuales en azúcares fermentables los cuales serán convertidos en alcohol incrementando la productividad de etanol (Cedeño, 2003)

8.1.5 Determinación de carbohidratos no fermentables presentes en los distintos tiempos de fermentación de las muestras de mosto de Sotol mediante la técnica de HPLC-RI

Debido a que la concentración de fructosa fue baja y los °Bx altos, se contempló la posibilidad de la presencia de otros compuestos. Por lo que se procedió a determinar si existían carbohidratos no fermentables en las muestras de mosto de Sotol.

Se observó que en las muestras aparecen distintos picos a los 7.8 minutos, 11.05 minutos y a los 3.7 minutos. (Cromatograma en el Anexo, PARTE III). Estos picos corresponden a

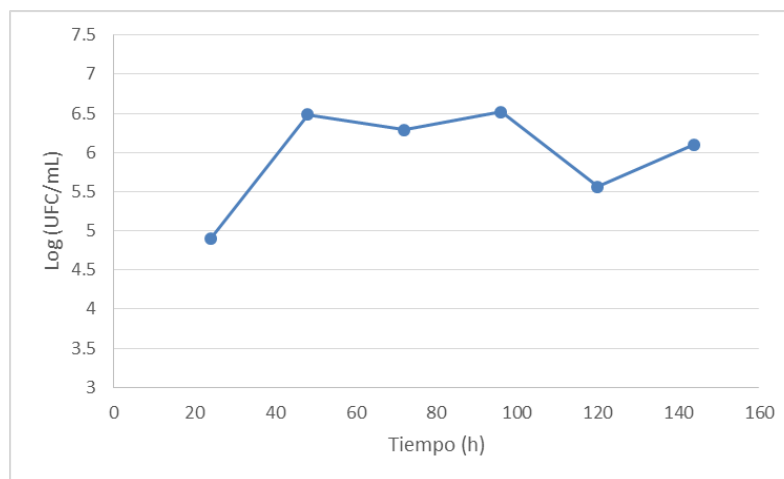
distintos tipos de polifruktanos, fructooligosacáridos y oligómeros, lo que podría sugerir una hidrólisis ineficiente, lo que afectó a la baja concentración de fructosa en el proceso de fermentación y afectó la medición de los °Bx.

8.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS MOSTOS DE SOTOL A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

8.2.1- Cuenta en placa de las levaduras a lo largo de la fermentación sobre medio YEA

En la Gráfica 6 se observa el conteo de levaduras durante la fermentación de mostos de *Dasyliirion* durante la elaboración de Sotol.

Se observa la variación de la población total de levaduras durante el transcurso de la fermentación.



Gráfica 6. Cuenta total de levaduras. Los datos corresponden al promedio de los conteos.


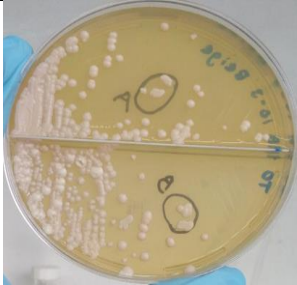
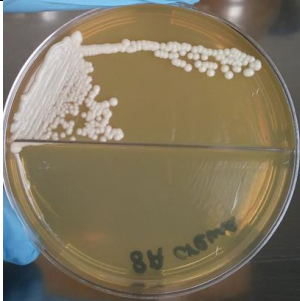
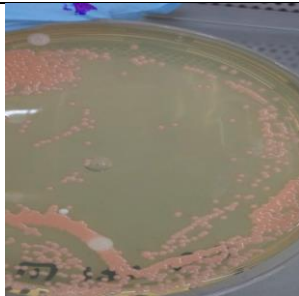
De acuerdo a lo observado en la Gráfica 6, las levaduras se mantienen presentes en todo el proceso de fermentación del mosto de Sotol y se observó que en las primeras horas el crecimiento microbiano alcanzó 10^6 UFC/mL y se mantuvo durante las 140 horas de la fermentación, lo que coincide con lo observado en los procesos de fermentación de otras bebidas similares como el caso del Mezcal (Pérez, 2013).

Los resultados observados a lo largo del proceso de fermentación ofrecen una visión del número y cómo se mantuvo el número de levaduras durante el proceso.

8.2.2. Observación de la morfológica de las levaduras cultivadas en placa

En la siembra por dispersión en placa en medio YEA y su posterior aislamiento por agotamiento, se encontraron 23 distintos tipos de colonias, las cuales se agruparon dentro de 4 grupos de acuerdo a su color, la descripción se muestra en la (Tabla 9).

Tabla 9. Grupos morfológicos de las colonias aisladas por siembra en placa sobre agar YEA.

Grupo	Características	Colonias
1 “Blancas”	Presentaron un color blanco, brillosas, con superficie y borde regular, de textura y apariencia lisa, ligeramente elevadas. En esta descripción se agrupó a: Blanca, blanca pequeña, blanca transparente, blanca grande, blanca convexa, blanca hoyo, blanca puntiforme.	
2 “Beige”	Colonias en tonalidades beige, ligeramente elevadas. Aquí se clasificaron a: Beige, beige clara, beige pequeño, beige rugosa	
3 “Crema”	De aspecto y textura cremosa, en tonos mate-opacos, con borde regular. En este grupo se encuentran: Crema, crema opaca, crema opaca con centro, crema pequeña, crema transparente, crema plana, crema convexa, crema muy clara, plana cremosa, plana crema transparente.	
4 “Salmón”	Colonias de colores rosa-salmón, brillantes, con textura y aspecto cremoso, con superficie lisa. Aquí se encuentra: Salmón y Blanca salmón.	

Las colonias “plana crema transparente” y “blanca convexa” estuvieron presentes en todos los tiempos de fermentación y fueron las que se aislaron con mayor frecuencia.

Las colonias “crema opaca”, “plana cremosa”, “crema transparente”, “crema muy clara”, “beige”, “crema”, “blanca puntiforme”, “blanca dona” y “beige clara” presentaron una frecuencia de aislamiento muy cercana entre sí, siendo las siguientes colonias aisladas con mayor frecuencia. Estas colonias estuvieron presentes desde los primeros tiempos de fermentación, pero al final del proceso su frecuencia disminuyó.

Las colonias “salmón” y “blanca salmón” solamente se observaron a las 96 y 120 horas de fermentación.

8.2.3 Observación microscópica de las colonias aisladas

Se observaron bajo microscopio las 23 colonias encontradas en placas, se pudieron diferenciar 14 características celulares de las colonias originalmente observadas, descritas en la (Tabla 10).

Tabla 10. Fenotipos de las distintas levaduras encontradas a lo largo de los tiempos de fermentación.

Número de morfología	Descripción de la morfología
1	Levaduras ovoides grandes, planas, sin agrupación definida, transparentes, esta morfología corresponde a las colonias “Blancas convexas”, las cuales fueron una de las dos morfologías mayormente observadas.
2	Circulares, a esta morfología corresponden las colonias opaca, crema opaca y crema opaca con centro.
3	Pequeñas, circulares, las colonias “plana cremosa” presentan esta morfología.
4	Ovoides pequeñas y alargadas, sin agrupación definida, las colonias “plana crema transparente” comparten esta morfología. Esta fue una de las dos morfologías observadas con mayor frecuencia.
5	Apiculadas alargadas, las colonias “Crema transparente” presentan esta descripción
6	Levaduras grandes ovoides, algunas agrupadas en pares. La colonia “Salmón” representa este grupo. Esta morfología sólo se observó en dos tiempos de fermentación.

7	Ovoides agrupadas en pares. Beige clara coincide con esta descripción.
8	Alargadas, sin agrupación definida, las levaduras “Beige representan esta morfología”
9	Circulares, pequeñas sin agrupación, “Beige rugosa” concuerda con esta descripción.
10	Grandes, sin agrupación, “crema opaca con centro” representa este grupo
11	Ovoides, pequeñas, alargadas, agrupadas en una especie de ramillete. Crema muy clara, presenta esta morfología.
12	Circulares, grandes, se agrupan en más de 7 formando conjuntos circulares.
13	Alargadas, ovoides, sin agrupación definida esta descripción corresponde a blanca puntiforme.
14	Levaduras circulares con una especie de halo rodeándolas. A esta descripción corresponde blanca salmón. Esta morfología sólo se observó en un tiempo de fermentación.

Con el fin de diferenciar o agrupar las diferentes colonias con un fundamento molecular se decidió realizar el método de identificación PCR-RFLP de la región 5.8-ITS.

8.2.4. Extracción del ADN de las cepas aisladas de los mostos a lo largo de la fermentación

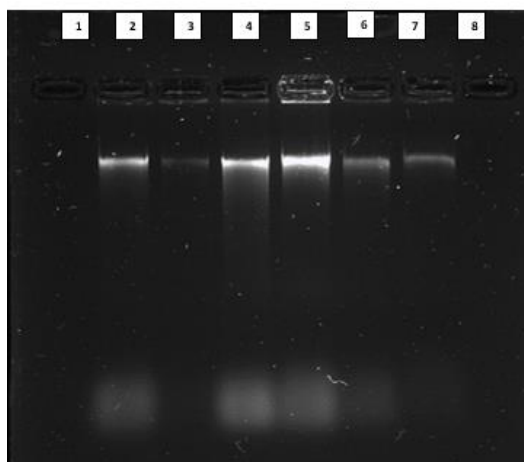


Figura 20.- Ejemplo de algunas extracciones de DNA colocado en gel de agarosa al 1% revelado en un decodificador de gel. Muestras: **1)** Buffer de carga, **2)** opaca, **3)**puntiforme, **4)** dona D **5)**plana **6)** puntiforme, **7)**crema **8)** nada

8.2.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS POR EL MÉTODO PCR-RFLP DE LA REGIÓN 5.8-ITS

8.2.5.1. Amplificación de la región 5.8S-ITS de algunas cepas aisladas.

En la Figura 21 se observan diferentes tamaños de amplificado lo que sugiere la presencia de diferentes especies de levaduras en la fermentación.

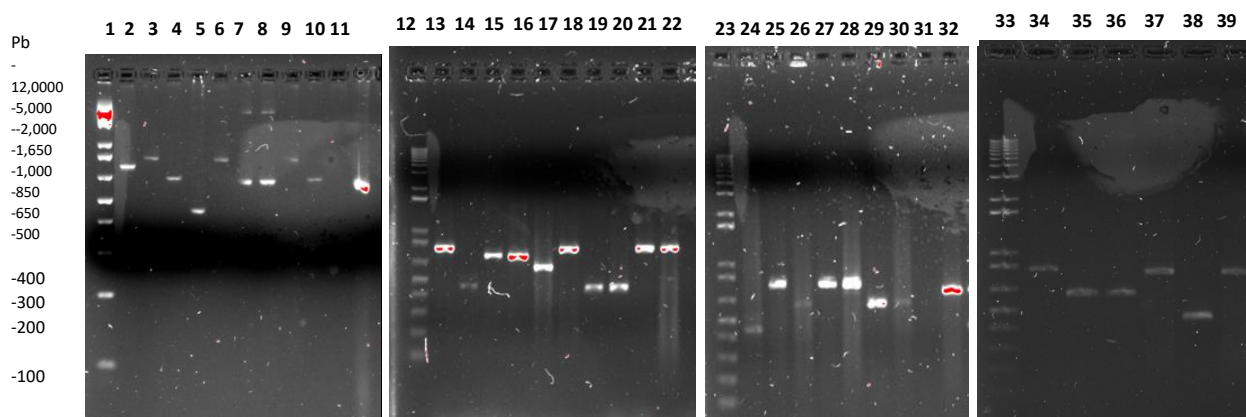


Figura 21. Amplificación de la región 5.8S-ITS de algunas cepas aisladas. **1)** marcador de peso molecular 1kb Invitrogen **2)**plana, **3)**beige claro, **4)**Beige A, **5)**crema opaca, **6)**blanca grande **7)**blanca pequeña, **8)**salmón, **9)**plana, **10)** crema transparente, **11)** Blanca **12)** marcador de peso molecular 1kb Invitrogen **13)**blanca convexa **14)**opaca **15)**plana cremosa **16)**plana transparente **17)**crema transparente **18)**Beige claro **19)**Rugosa **20)**crema **21)**crema muy clara **22)**Blanca salmón **23)**marcador de peso molecular 1kb **24)**blanca convexa **25)**blanca convexa **26)**beige **27)**crema **28)**crema **29)**crema transparente **30)**crema transparente **31)**nada **32)**plana transparente **33)**marcador de peso molecular **34)**Beige A **35)**Beige B **36)**dona **37)**Blanca pequeña **38)**crema opaca **39)**salmón.

Los tamaños obtenidos fueron 750, 600, 650, 850, 450, 660 y 800. Se puede observar que de las 29 muestras amplificadas, 15 muestras presentan tamaños iguales, por ejemplo, blanca pequeña y crema transparente presentan el mismo tamaño de amplificado; al igual que blanca convexa y plana cremosa.

En vista de que hubo varias muestras que no se pudieron diferenciar, se hizo el análisis de restricción.

8.2.5.2 Análisis de restricción de los amplicones

Con las enzimas *Hinf I*, *Hha1* y *Hae III* se generó un patrón especie-específico útil para ubicar a las cepas, algunos de los resultados se muestran en las (Figura 22 y Figura 23) Los resultados del análisis de restricción se muestran en la Tabla 11.

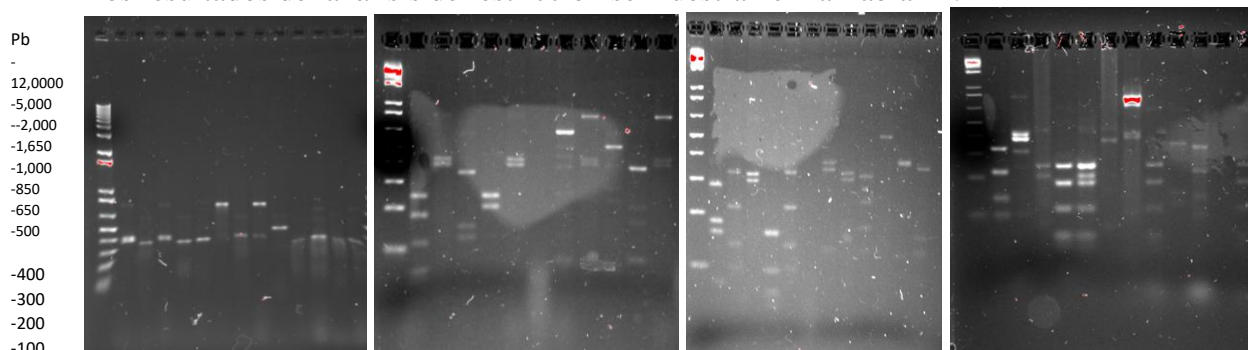


Figura 22. Algunos perfiles de restricción de cepas aisladas de la fermentación, utilizando las enzimas: *Hinf I*, *Hae3* y *Hha1*. **1)** marcador, **Cortes con *Hinf I*** **2)** blanca pequeña, **3)** salmón, **4)** plana **5)** crema transparente, **6)** control positivo. **Cortes con *Hae 3***: **7)** blanca pequeña, **8)** salmón, **9)** plana, **10)** crema transparente, **11)** control positivo. **Cortes con *Hha1***: **12)** blanca pequeña, **13)** salmón, **14)** plana, **15)** marcador, **Cortes con *Hinf I***: **16)** plana, **17)** beige claro, **18)** Beige A, **19)** crema opaca, **20)** blanca grande, **21)** Blanca, **Cortes con *Hae 3***: **22)** plana, **23)** beige claro, **24)** Beige A, **25)** crema opaca, **26)** blanca grande. **27)** marcador, **Cortes con *hha1***: **28)** plana, **29)** beige claro, **30)** Beige A, **31)** crema opaca, **32)** blanca grande, **33)** Blanca, **34)** Beige A, **35)** puntiforme, **Cortes con *Hae 3***: **36)** Beige A, **37)** puntiforme, **Cortes con *Hinf I***: **38)** Beige A, **39)** puntiforme. **40)** marcador **41)** Beige claro *Hha1*, **42)** Blanca convexa *Hinf I*, **43)** convexa *Hinf I*, **44)** plana transparente *Hinf I*, **45)** Rugos *Hinf I*, **46)** Beige pequeña *Hinf I*, **47)** Blanca convexa *Hae3*, **48)** plana cremosa *Hinf I*, **49)** plana *Hinf I*, **50)** blanca pequeña *Hha 1*, **51)** Rugosa *Hinf I*, **52)** Blanca transparente *Hinf I*.

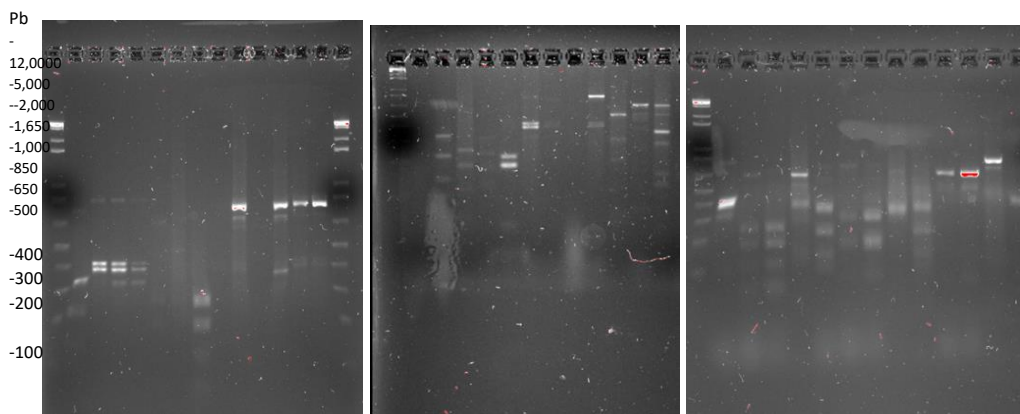


Figura 23. Algunos perfiles de restricción de cepas aisladas de la fermentación, utilizando las enzimas: *Hinf I*, *Hae3* y *Hha1*. **1) Marcador** **2)** Crema *Hha 1* **3)** crema *Hinf I*, **4)** crema *Hinf I*, **5)** crema muy clara *Hinf I*, **6)** Beige pequeña *Hinf I*, **7)** Blanca convexa *Hinf I*, **8)** blanca transparente *Hinf I*, **9)** crema muy clara *Hae 3*, **10)** crema *Hae3*, **11)** beige pequeña *Hae 3*, **12)** opaca *Hae3*, **13)** Blanca convexa *Hae 3*, **14)** crema *Hae3* **15)** marcador. **16) marcador** **17)** Blanca pequeña *Hha1*, **18)** Beige pequeña *Hha1*, **19)** crema muy clara *Hinf I*, **20)** salmón *Hae 3* **21)** plana *Hinf I* **22)** Beige pequeña *Hinf I* **23)** Rugosa *Hinf I* **24)** Opaca *Hinf I*, **25)** Beige pequeña *Hae 3*, **26)** crema transparente *Hae 3*, **27)** plana cremosa *Hae 3* **28)** crema transparente *Hinf I* **29)** marcador *Hinf I*: **30)** Blanca convexa, **31)** plana cremosa, **32)** plana transparente **33)** crema transparente *Hha1*: **34)** Blanca convexa, **35)** plana cremosa, **36)** plana transparente, **37)** crema transparente, **38)** blanca salmón *Hae3*: **39)** plana cremosa, **40)** plana transparente, **41)** Blanca salmón, **42)** Rugosa

Al tener información acerca del tamaño del amplicón y los respectivos cortes de restricción, se procedió a comparar con los patrones obtenidos en la base de datos Yeast Id. La información se sintetiza en la (Tabla 11).

Tabla 11.- Tamaño (en pb) del amplicón de la región 5.8 S-ITS, de los fragmentos de restricción obtenidos por las enzimas: *HinfI*, *HhaI* y *Hae III* y la probabilidad de microorganismo encontrada en la base de datos yeast-id.

Muestra/Enzima	5.8S-ITS	Hinf 1	Hha 1	Hae 3	Probabilidad de microorganismo
plana	750	250 +150+350	300 +400	500 +300	99.9% <i>Saccharomyces exiguus (Kazachstania exigua)</i>
Crema transparente	600	190+310	300+300	90+500	92% <i>Candida cantarellii</i>
Puntiforme	650	320+310	300+305	490	88% <i>Pichia segobiensis</i>
Crema muy clara	750	320+320	250	750	88% <i>Candida succiphila</i>
Salmón	650	300+350	300	400+180	84% <i>Millerozyma acaciae (Pichia acaciae)</i>
Beige clara	850	375+110	150+325+375	495+230	84% <i>Saccharomyces bayanus</i> , 84% <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> , 84% <i>Saccharomyces pastorianus</i> .
Beige A	650	150+170+330	290	410	83% <i>Candida aaseri</i>
Blanca pequeña	650	300+350	300+300	400	83% <i>Millerozyma acaciae (Pichia acaciae)</i>
Dona	650	300+300	290+290	630	75% <i>Priceomyces carsonii (Pichia carsonii)</i>
Beige B	450	270	200+250	450	75% <i>Phaffomyces opuntiae (Pichia opuntiae)</i> 75% <i>Saturnispora besseyi (Pichia besseyi)</i>
Crema opaca con centro	450	250+200	450	400	75% <i>Pichia burtonii</i>
Crema opaca	450	200+250	70+180+200	400	75% <i>Pichia heedii</i>
Plana cremosa	660	215	300	400	75% <i>Rhodotorula minuta</i>
Crema	850	400+270	250+350+210	560	75% <i>Zygosaccharomyces mellis</i>
Blanca salmón	800	-	400	580	75% <i>Pichia naganishii</i>

Se obtuvieron resultados con probabilidades entre el 75% y el 99%.

8.2.5.3 Secuenciación de la región 5.8 S-ITS de algunas cepas aisladas en mostos de Sotol.

El porcentaje de identificación de algunas cepas fue bajo, menor a 75%, por lo cual se decidió hacer la amplificación y posterior secuenciación de la región 5.8 S-ITS y su posterior comparación utilizando la herramienta BLAST. Los resultados se muestran en la (Tabla 12)

Tabla 12. Identificación por comparación de secuencias de la región 5.8S-ITS

Nombre de la cepa	Caracterización por secuenciación
Opaca	<i>Pichia kluyveri</i>
Rugosa	<i>Pichia kluyveri</i>
Crema	<i>Torulaspóra</i>
Blanca convexa	<i>Torulaspóra delbrueckii</i>
Plana transparente	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Se encontraron especies de los géneros: *Kluyveromyces*, *Torulaspóra*, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Rhodotorula*.

Con base a la frecuencia de aislamientos, observaciones microscópicas de los distintos fenotipos y la identificación molecular, se encontró que *Kluyveromyces marxianus* junto con *Torulaspóra delbrueckii* son las levaduras principales en esta fermentación.

Kluyveromyces marxianus produce varias enzimas de interés tecnológico como la lactasa, la cual es producida a nivel industrial (Castillo, 1990), pectinasa (Phaff, 1966., Wimborne y Rickard, 1978) e inulinasa (Vandarnrne y Derycke, 1983., Giraud y Galzy, 1990).

Considerando que el mayor esfuerzo está dirigido a producir inulinasa para aplicarlo en la producción de jarabe enriquecido de fructosa, como un edulcorante de bajo poder calórico, las cepas de *Kluyveromyces marxianus* tienen el status de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y QPS (*Qualified Presumption of Safety*) en los Estados Unidos y en la Unión Europea respectivamente, son preferidos para la producción de inulinasa con fines alimentarios y biotecnológicos (Lane y Morrissey, 2010).

Es especialmente adecuada para la aplicación industrial, por tener la mejor velocidad de crecimiento que cualquier otro microorganismo eucarionte termotolerante, con habilidad para crecer sobre los 52°C, capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves, como la lactosa e inulina y una alta capacidad secretora de enzimas líticas, hacen de este microorganismo líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos (Lane y Morrisey, 2010)

Torulaspota delbrueckii se encuentra frecuentemente en bebidas alcohólicas, zumos de fruta y alimentos con alto contenido en azúcares (Esteve-Zarzoso y col., 2001). Se ha recomendado ampliamente para mejorar características específicas de vinos (Jolly et al., 2006; Bely et al., 2008; Renault et al., 2009). Esta levadura también se puede usar para aumentar la concentración de glicerol (Contreras et al., 2015) y de mannoproteínas (Comitini et al., 2011; Belda et al., 2015). Se ha reportado que la inoculación mixta de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* reduce compuestos de sabor desagradable (Herraiz et al., 1990; Bely et al., 2008), y conduce a un aumento sistemático de 2-feniletanol, terpenoles y lactonas (Herraiz et al., 1990; Comitini et al., 2011)

Las siguientes levaduras en orden de abundancia son: *Pichia kluyveri*, *Kazachstania exigua*, las del género *Candida*, *Zygosacharomyces* y *Saccharomyces*. Presentando una frecuencia de aislamientos muy cercana entre sí, a lo largo de la fermentación.

Pichia kluyveri se distribuye ampliamente en la naturaleza y es comúnmente aislada de la fruta podrida y las partes carnosas de las plantas (Phaff, 1966).

Amaya et al., (2013) reportan que en fermentaciones para la producción de Tequila, *Pichia kluyveri* produjo niveles más altos de lactato de etilo y ésteres los cuales contribuyen al aroma final del tequila, que *S. cerevisiae* y *K. marxianus*.

En ese mismo estudio, se probaron cepas de *Pichia kluyveri* para la producción de tequila a nivel industrial, dando compuestos volátiles deseados.

En otras fermentaciones, se ha encontrado a *Pichia kluyveri* en fermentación del café, (Masoud y Jespersen, 2006) demostraron que *P. kluyveri*, produce enzimas pectina-degradantes.

Kazachstania exigua (ex *Saccharomyces exiguus*) (Kurtzman, 2003) la re-nombra *Kazachstania exigua*. Es una levadura aislada de diferentes fuentes alimenticias como: masa fermentada (Sugihara, 1970; Pulvirenti, 2004) granos de Kefir (Vardjan, 2013) y Mezcal (Verdugo, et al, 2011). Se han aislado repetidas veces cepas de *Saccharomyces exiguus* como levadura que interviene en vinos de palma (Nyiri, 1972; Okafor, 1972), conteniendo un promedio aproximado de 4-5° de etanol y un pH de 3-4. Crece mejor que *Saccharomyces cerevisiae* en ácido acético (Sugihara, 1970).

Especies pertenecientes al género *Candida*: Son ampliamente encontradas y aislada durante la fermentación de mostos de vinos (Parish & Carroll 1985; Mora et al. 1988). Se informa que estas especies contribuyen a la fermentación, mejoran la calidad de vinos e impactan en las características sensoriales, mediante la producción de compuestos como glicerol, acetoína, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, ácido succínico, ácido acético, éstos de vino. (Ciani, 1995; Lema et al. 1996).

En la fermentación de mostos de *Dasyliirion* se encontraron tres especies: *Candida cantarellii*, *Candida succiphila* y *Candida aaseri*.

Zygosaccharomyces: Se encuentra ampliamente documentada en fermentaciones vínicas (Moore, 1998, Romano, 1998, Esteve-Zaroso et al, 1999, Esteve-Zaroso et al, 2001) y también han sido encontradas en mostos de *Agave tequilana* weber (Lachance, 1995).

Por otra parte, se encontró con más de un perfil de identificación para una muestra, la base de datos Yeast id, arrojó que los perfiles de restricción son iguales para: *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* y *Saccharomyces pastorianus*. Y menciona que existe un 84% de probabilidad de que sea cualquiera de estos tres microorganismos.

La existencia de más de un perfil de restricción para cepas de la misma especie ha sido reportado (Esteve-Zaroso et al, 1999).

Esto se puede deber a que *Saccharomyces pastorianus* es un híbrido alotetraploide parcial entre dos especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Nguyen et al., 2000)

Incluso durante un tiempo se pensó que *Saccharomyces pastorianus* y *S. bayanus* eran la misma levadura (Rainieri, et al., 2006).

Naumov et al., (1993) menciona que las especies del género *Saccharomyces* son difíciles de distinguir, estas cepas se pueden asignar inequívocamente a una de las especies hermanas debido a la base de la compatibilidad genética.

Se han mostrado resultados inequívocos con los métodos de identificación de morfología convencional y pruebas de asimilación (es decir, criterios de identificación genética), o métodos moleculares, tales como los de cariotipo; experimentos de reasociación nDNA / nDNA; hibridación con sondas específicas de especie; PCR de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD); o secuenciación. (González, et al., 2006).

Los híbridos se pueden identificar usando métodos como el análisis del gen MET2, el análisis de marcadores multilocus, como el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) o RAPD, el análisis de diferentes regiones de genes nucleares ubicadas en diferentes cromosomas (por ejemplo, CAT8, CYR1, GSY1, MET6 y OPY1) y la secuencia del gen mitocondrial COX2. (González S., et al, 2006).

Saccharomyces pastorianus .Responsable de la fermentación para la producción de cerveza lager.

Saccharomyces bayanus se ha aislado principalmente en la elaboración del vino y de Sidra. (Togores, 2003) y en cervezas (Nguyen., 2005).

Los microorganismos no mencionados pero que están enlistados en los microorganismos identificados, no se han encontrado participando en fermentaciones alcohólicas.

Por ejemplo, para *Rhodotorula* (Phaff, 1978) muestra que en pastos, uno de los géneros mayoritarios presentes, pertenecía al género *Rhodotorula*.

La aplicación del RFLP permitió una identificación rápida y relativamente sencilla de todas las levaduras aisladas de mostos de Sotol hasta el nivel de género. La asignación en el nivel de especie también fue muy aceptable, la principal dificultad que se presentó fue asignar los pesos moleculares correctos a los fragmentos obtenidos.

Estos resultados coinciden con diferentes trabajos realizados en bebidas similares que señalan al RFLP-ITS como una técnica confiable para identificar levaduras e identificar cepas diferentes. (Arias et al 2002, Balerias Couto et al 1996, Guillermon et al 1998, Esteve-Zarzoso et al, 1999, Espinosa et al 2002).

9. CONCLUSIONES

-Al inicio de la fermentación, se encontró una mayor diversidad de fenotipos los cuales fueron desapareciendo en el transcurso de la fermentación.

-Esta fermentación se llevó a cabo predominantemente por levaduras del género *Saccharomyces*.

-Los microorganismos identificados que se aislaron con mayor frecuencia a lo largo de la fermentación fueron: *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus*.

-Además, se encontraron especies de los géneros: *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Rhodotorula*. Sin embargo, probablemente no todas ellas participan en la fermentación, como es el caso de *Rhodotorula minuta*, ya que comúnmente no están asociadas a fermentaciones alcohólicas.

- El rendimiento de esta fermentación fue del 69.5%

10. PERSPECTIVAS

La fermentación

-Ampliar el número de Sotolerías para poder realizar estudios más amplios acerca de la microbiota, esto nos daría evidencia mas detallada de los microorganismos que están en las fermentaciones.

-Poder relacionar a los microorganismos que se encuentran en la región con los compuestos que pudieran estar presentes en el producto final.

-La caracterización exhaustiva de la microbiota en el mosto incluyendo también bacterias que pudieran estar presentes y que seguramente tienen un impacto en el sabor del producto terminado.

-El estudio de la dinámica de poblaciones, para después poder estudiar el impacto de las diferentes cepas en el destilado y seleccionar así una o varias cepas que posean la mayor cantidad de características deseables para el proceso como tolerancia a etanol, a estrés osmótico y térmico, elevada producción de congenéricos, etc.

-Componer un inóculo mixto y estudiar su desarrollo en una fermentación tradicional para determinar la implantación sobre las levaduras nativas y la contribución real.

Estudio del proceso

-Entender cuáles podrían ser los métodos adecuados para la hidrólisis.

-Investigar sobre la formación de compuestos generados después de la cocción de los tallos y que inhiben el crecimiento de levaduras o que afectan la eficiencia de la producción de etanol.

Composición química de *Dasyllirion*

-Ampliar el estudio sobre el tipo de inulina y los fructooligosacáridos presentes en *Dasyllirion*.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acosta Romero, C.** (2012) “Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel”. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia, pp. 45-47.
2. **Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hagerdal B, Liden G, Gorwa Grauslund MF.** (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol.* **82**:340–9.
3. **Álvarez-Ainza, M.L., Zamora-Quiñonez, K.A. y Acedo-Félix, E.** (2009). Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora, *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **51**: 58-63.
4. **Amaya Delgado L., Herrera López E.J., Arrizon J., Avellano Plaza M., Gschaedler A.** (2013). Performance evaluation of *Pichia Kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* **29**:875-881.
5. **Andrade Meneses, O.** (2007) “Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8S-ITS aislada durante la fermentación de mezcal de la región Sola de Vega Oaxaca.” *Tesis de maestría.* Universidad Nacional Autónoma de México. **45**, 57-59.
6. **Andrews, R. E., L. W. Parks, and K. D. Spence.** (1980). Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:301-304.
7. **Apriyantono, A.; Ames, J. M.** (1993). Xylose-lysine model systems: the effect of pH on the volatile reaction products. *J. Sci. Food Agric.***61**: 477-484.
8. **Arias C.R., J.K. Burns, L.M. Friedrich, R.M. Goodrich, and M.E. Parish.** (2002). Yeast Species Associated with Orange Juice; Evaluation of Different Identification Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1995-1961.
9. **Banerjee, N., R. Bhatnagar, and L. Viswanathan.** (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 224-228.
10. **Bautista Flores, Elizabeth.** (2013). Estrategias de Branding para la comercialización del Sotol como alternativa de negocios en el norte de México. División Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
11. **Barnett J.A., Payne R. W., Yarrow D.** (2000). *Yeast Characteristics and identification*, third edition, UK. Cambridge editorial.

12. **Barnett, J.A.** (2004). "The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: A short review for non-taxonomists" *Yeast*, **8**:1-23.
13. **Bedinghaus, A. J.; Ockerman, H. W.** (1995). Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino acids in cooked ground pork patties. *J. Food Sci.* **60**: 992-995.
14. **Balerias Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L.** (2005) "Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise *non-Saccharomyces* yeast present during red wine fermentations." *International Journal of Food Microbiology*, **102**:49-56.
15. **Badui Dergal S** (1999). Water in Food chemistry, edition by Pearson Education 3th edition, pp. 26-28.
16. **Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D.** (2008). Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **122**: 312–320.
17. **Beltrán Gemma, Toija María de Jesús, Novo Mite, Ferr Nemi, Poblet Montserrat.** (2005). Analyses of Yeast population during alcoholic fermentation: A six years follow-up study. *System. Appl.Microbiol.* **25**:287-293.
18. **Benn, S. M.; Peppard, T. L.** (1996) Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 557-566.
19. **Boulton Roger; Vernon Singleton; Linda Bisson; Ralph Kunkee** (1996). Principles and Practices of Winemaking. Chapman & Hall.
20. **Castillo, F.** (1990) Lactose metabolism by yeast. *Yeast Biotechnology and Biocatalyst*. Verachtert, H. y De Mot R. (Ed.) Marcel Dekker. Nueva York.
21. **Cedeño M.** (2003) Tequila Production from Agave: Historical influences and contemporary process. *The Alcohol Textbook*. 4th Edition. Pp: 223-245.
22. **Chaucheyras, F.; Millet, L. y Michalet, B.** (1997). Effect of the addition of LEVUCCELL *Saccharomyces cerevisiae* on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. In: Proc. of Evol. Of the Rumen Microbial Ecosyst. 20-21, Chesson, A.; Stewart, CS. and Flint, HJ. (eds), RRI-INRA. *Rumen microbiology Symposium*, Aberdeen (UK).
23. **Chihuahua Turismo**, (s.f). Mapa de ciudades, pueblos, colonias y localidades.[Figura]. Recuperado de <http://www.chihuahuamexico.com.mx/mapa-de-chihuahua/>
24. **Ciani, M. & Picciotti, G.** (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*. **17**: 1247–1250.

25. **Comarca.** (2012). Coahuila, Líder Mundial en producción de sotol, noticias del sol de la laguna, agosto: <http://www.oem.com.mx/noticiasdelsoldelalaguna/notas/n2653691.htm>.
26. **Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos indígenas.** (2014). Bebidas tradicionales de los pueblos indígenas de México. En: http://www.Cdi.gob.mx/index.php?option=com_content&id=2887.
27. **Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al.** (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**: 873–882.
28. **Contreras, C. and I. Ortega** (2005). Regions and drinks. Plaza and Valdes. México.
29. **Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C. y Varela, C.** (2015). The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *Int. J. Food Microbiol.* **205**: 7–15.
30. **Cova Pérez, C.** (2010). “Caracterización molecular de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la fermentación de Mezcal, Pulque y Tequila”. *Tesis de licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 4-12.
31. **Cronquist, A.** (1981). An integrated system of classification of flowering plant. EUA. The New York Botanical Garden.
32. **Cruz Requena M., De la Garza Toledo H., Aguilar González C.N., Aguilera Carbo A., Reyes Valdés H., Rutiaga M., Rodríguez Herrera R.** (2013). Chemical and Molecular properties of Sotol plants (*Dasyliirion cedrosanum*) of different sex and its fermentation products. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*. Vol. 3 (1). Pp: 41-49.
33. **De la Garza, H.** (2000) Cambios tecnológicos en la producción de Sotol. *Research Journal of Biological Sciences*, **2**.
34. **De la Garza Toledo, H.** Production of a Mexican alcoholic beverage: Sotol. (2008)
35. **De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Barbara de la Rosa, A. y Blascheck, H.P.** (2008). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response Surface methodology. *Chemical Engineering Progress*. **47 (1)**: 76-82.
36. **Dlauchy, D., Torní-Lehoczki, J., Gárbor, P.** (1999) “Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification.” *Systematic and Applied Microbiology*, **22**: 445-453.

37. **Enriquez, J.** (2016). Guía de Exportación de Mezcal a Estados Unidos. Trabajo Monográfico de Actualización. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
38. **Escalante-Minakata, P., González Hernández L., Barba de la Rosa, A.P., De León-Rodríguez, A.** (2006). El mezcal, una mezcla de alcoholes y feromonas. *Bebidas Mexicanas*. **15(3):** 10-18.
39. **Espinosa Juan Carlos, Fernandez Gonzalez Monica, Ubeda Juan** (2002). "Identification of White Wine Yeast by PCR-RFLP without previous isolation on the plate" *Food Technology and Biotechnology*, **40**. pp 157-160.
40. **Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A.** (1999) "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers" *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49:** 329-337.
41. **Esteve-Zarzoso Braulio, Peris-Toran M.J., García-Maiquez E., Uruburu F.,** (2001) "Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines", *Applied and Environmental Microbiology*, **67:**2056-5061.
42. **Ferrari, M.E., E. Neirotti, C. Albornoz, and E. Saucedo.** (1992). Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnology Bioengineering*. **40:** 753-759.
43. **Fernández Espinar Ma. Teresa, Braulio Esteve-Zarsozo, Querol Amparo, Barrio Eladio,** (2000). "RFLP analysis of the ribosomal internal Transcribe Spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts" *Antonie van Leeuwenhoek* **78:** 87-97.
44. **Frank, O.; Hofmann, T.** (2000). Characterization of key chromophores formed by nonenzymatic browning of hexoses and L-alanine by using the color activity concept. *J. Agric. Food Chem.* **48:** 6303-6311.
45. **Gallagher, S.** (1998). Molecular Biology Techniques. Detection of nucleic acids using absorption spectroscopy en *Current Protocols in Protein Science*, Suplemento 13, Apéndice 4K.1. John Wiley & Sons, Inc.
46. **Gallegos-Vázquez G, Valdez-Cepeda RD, Barragan-Macías M, Barrietos-Priego AF, Andrés Agustín J and Nieto-Ángel R** (2006). Morphological characterization of 40 cultivars of

paddle cactus used as vegetal crop from the Crucen-UA Chgermplasmbank. *Revista Chapingo Serie horticultura*. **12** :41-49.

47. **García S, A.** (1952). Comparación del Sotol y la alfalfa en la alimentación de vacas lecheras. Tesis profesional. UAAAN. 1952.
48. **Giraud, J., Galzy,P.** (1990). Inulin conversión by yeast. In: *Yeast Biotechnology and Biocatalysis* (Veracherter, H). Marcel Dekker. Nueva York.Págs. 225-296.
49. **González S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A.** (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*. **6**: 1221-1234.
50. **Guillamon José Manuel, Sabate Josepa, Barrio Eladio, Cano Joseph, Querol Amparo** (1998) “Rapid identification of wine species base don RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) región”, *Archives in Microbiology* **169**: 387-392.
51. **Hoffman C.S., Winston F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently reléase autonomous plasmids from transformation of *Escherichia Coli.*; *Gene*, **57**: 267-272.
52. **Hollnagel, A.; Kroh, L. W.** (2000). Degradation of oligosaccharides in nonenzymatic browning by formation of R-dicarbonyl compounds via a “peeling off” mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 6219-6226.
53. **IMPI.** (2002). Instituto Mexicano De La Propiedad Industrial. Retrieved from <http://marcanet.impi.gob.mx/marcanet/controler/>
54. **Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., and Pretorius, I. S.** (2006). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **27**: 15–39.
55. **Kirk RS, Sawyer R and Egan H** (1996). *Food composition and analysis*, edition by Pearson. 2nd Edition. pp. 29.
56. **Kurtzman, C.P., Robnett, C.J.** (1998) “*Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.*” *Antonie Van Leeuwenhoek*, **73**:331-71.
57. **Kurtzman Cleutts P** (1992) “rRNA sequence comparisions for assesing phylogenetic relationship among yeast”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 1-6.
58. **Kurtzman, C.P., Robnett C.J** (2003). “Phylogenetic relationship among yeast of the *Saccharomyces complex* determined from multigene sequence analyses”. *FEMS Yeast Research*, **3**: 417-432.

59. **Lachance Marc-André.** (1995) “Yeast communities in a natural tequila fermentation”, *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 151-160.
60. **Lane, M.; Morrissey, J.** (2010) *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biology Reviews*.
61. **Lappe, P., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, a., Gschaedler, A.** (2008) “Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages” *FEMS Yeast Research*. **8**:1037-1052.
62. **Leal Granadillo, I., Tarantino Rodriguez, G., Hernández Motzezak, R., Morán Guillén H.** (2014) “Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación de mostos de *Agave cocui*” *Multiciencias*. **14-4**:375-381.
63. **Lehninger, Albert L.** (1988). *Principios de bioquímica*. Barcelona: Omega. pp. 283-7.
64. **Lewkowski J. Synthesis** (2001). Chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. *Arkivoc*. 17–54.
65. **Lema, L., García-Jares, C., Orriols, I. & Angulo, L.** (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**: 206–216.
66. **Liu, Z. L.; Slininger, P. J.; Dien, B. S.; Berhow, M. A.; Kurtzman, C. P.; Gorsich, S. W.** (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 345–352.
67. **López, B. Portes V.** (2002). *El Sotol, una planta muy especial*. Manual del productor. Print Power. México. 1ª edición.
68. **López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. y Mendoza-Díaz, G.** (2003). Molecular structure of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7835-7840.
69. **Mancilla-Margalli, N. A. y López, M. G.** (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 7832-7839.
70. **Masoud, W.; Jespersen, I.** (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology*, v. **110**: 291-296.
71. **Mora, J., Barbas, J.I., Ramis, B. y Mulet, A.** (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **39**: 344–346.

72. **Moore K.J. Johnson M.G.** (1998) "Indigenous Yeast Microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinífera*) Grapes and in Model Must Systems" *Journal of Food Science*, **53**: 1725-28.
73. **Naumov GI, Naumova ES & Gaillardin C** (1993) Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. *Syst Appl Microbiol.* **16**: 274–279.
74. **Negróni, M.; D'Agostina, A.; Arnoldi, A. (2000).** Autoxidation in xylose/ lysine model systems. *J. Agric. Food Chem.***48**: 479483.
75. **Nguyen HV, Lepingle A & Gaillardin C** (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S.cerevisiae* including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl Microbiol* **23**: 71–85.
76. **Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G.** (2003). *Bioreaction engineering principles*. New York, Plenum Publishers.
77. **Nielsen Suzanne S.** "Análisis de los alimentos" 3ª edición. Editorial ACRIBA. 2006:259.
78. **Nyiri, L.K, & K.P. Jefferia, III** (1975) S.C.P. IN SUBMERGED CULTURES.S.R. Tannenbaum & D.C.I. Wang (Editors) M.I.T. Press. Cambridge, Mass. U.S.A.
79. **NOM-159-SCFI-2004.** (2004). Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y Métodos de Prueba. Planta
80. **Ochoa, J.L.; Vázquez, R.** (2004). Las levaduras marinas como herramientas científicas y biotecnológicas. Número Especial **I**, 39-50.
81. **Okafor, N.** (1972) Palm-wine yeast from parts of Nigeria. *Journal Science Food Agronomics* **23**: 1399-1407.
82. **Olsson, L., and B. Hahn-Ha"gerdal.** (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **18**:312–331.
83. **Ortega, R. Villavicencio.(s.f.)** Aspectos socioeconómicos y de comercialización del Sotol, derivados de su explotación en la Comarca Lagunera. Boletín Informativo. CIRNOC-INIFAP. Coahuila. México.
84. **Otero, M.A.; Vasallo, M.C.; Verdecia, O.; Betancourt, D.** (1995). Obtención de aditivos alimentarios a partir de levadura panadera. *Ciencia Tecnológica Alimentaria* **5**: (1-2) 62.
85. **Owen PW** (1989). *Fermentation Biotechnology*, edition by Acribia, S.A. Madrid, España. Pp. 133-137.

86. **Palma, E.J.I.** (2000). Bases para la propagación de Sotol (*Dasyilirion* spp) vía in vitro y por semilla. *Tesis de maestría*. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad Autónoma de Chihuahua.
87. **Pampulha, M.E. and M.C. Loureiro-Dias** (1989). Interaction of the effect of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology. Letters* **11**:269-274.
88. **Parish, M.E. & Carroll, D.E.** (1985) Indigenous yeasts associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture* **36**:165–169.
89. **Pérez, E.; González-Hernández, J.C.; Chávez-Parga, M.C.; Cortés-Penagos, C.**(2013) Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de Agave cupreata en la elaboración de Mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. vol. **12**, núm. **3**,451-461.
90. **Phaff, H.J. M.W Miller y E.M.Mrak** (1978). *The Life of Yeast*. Second edition. Harvard University Press.pp: 200.
91. **Phaff, H** (1966). α (1-4) polyalacturonide glycanohydrolase (endopolygalacturonase from *Saccharomyces sragifis*.*Meth.Enzymology*. **8**: 636-641.
92. **Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, Giudici P.** (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology*. **38**: 113-117.
93. **Rainieri, S., Kodama, Y. Kaneko, K. Mikata, Y. Nakao y T. Ashikari** (2006), Pure and Mixed Genetic Lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and Their Contribution to the Lager Brewing Strain Genome. *Appl. Envir. Microbiol.* **72**: 3968-3974.
94. **Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y.** (2003) “*Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetics diversity and evolution”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**:1-9.
95. **Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., et al.** (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **134**: 201–210.
96. **Reyes Valdész, H. Benavides Mendoza, A. Ramírez Rodriguez, H.** (2013). *Biología e importancia del Sotol parte II: Ecofisiología, usos e interrogantes*.
97. **Ribéreau, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., Lonvaud, A.** (2006). *Handbook of enology: Themicrobiology of wine and vinifications*, John Wiley & Sons.

98. **Ricca, E.; Calabró, V.; Curcio, S.; Dorio, G.** (2007). The State of the Art in the Production of Fructose from inulin Enzymatic Hydrolysis. *Crit Rev Biotechnol.* **27**: 129-145.
99. **Rivera, Q, J.R.** (1987). Aprovechamiento de candelilla, orégano y Sotol en la Comarca Lagunera. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Chapingo.
100. **Romano Patricia y Marchese Rosella** (1998). “Metabolic characterization of *Kloeckera apiculata* strains from star fruit fermentation”, *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 321-325.
101. **Rojas, A.** (1995) Obtención de proteína unicelular a partir de residuos de destilería. Proyecto de graduación. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Costa Rica.
102. **Rzedowski, J.** (1998). Vegetación de México. Editorial Limusa, México. 7ª edición.
103. **Sabate Josepa, Cano José, Esteve-Zarzoso Braulio, Guillamón José Manuel,** (2002) “Isolation and Identification of yeast associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes”, *Microbiological Research* **157**: 267-275.
104. **Santamaría, J. M., Herrera, J. L. y Robert, M. L.** (1995). Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant, *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regul.* **16**: 211-214.
105. **Sánchez-Marroquín, A. y Hope, P.** (1953). *Agave* juice: Fermentation and chemical composition studies of some species. *J. Agric. Food Chem.* **1**: 246-249.
106. **Scarpellino R, R J Soukup** (1993) Key flavors from heat reactions of food ingredients. In: Flavor Science. T E Acree, R Teranishi (eds). *American Chemical Society*, Washington, DC pp:309-333.
107. **Shaw, P. E.; Tatum, J. H.; Berry, R. E.** (1968). Base-catalyzed fructose degradation and its relation to non-enzymic browning. *J. Agric. Food Chem.* **16**: 979-982.
108. **Shu, C. K.** (1998) Flavor components generated from inulin. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 1964-1965.
109. **Sierra Tristan, S.** (2008). Los Sotoles (*Dasyliirion* SPP) de Chihuahua. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias.
110. **Southgate, D.A.T.** (1991). Determination of Food Carbohydrates. Second Edition. Elsevier *Applied Science.* **18**: 29-31, 53-57 y 73.
111. **Suárez-Machín, Caridad; Garrido-Carralero, Norge Antonio; Guevara-Rodríguez, Carmen Amarilys.** (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), **vol. 50, núm. 1**: 20-28.

112. **Sugihara TF, Kline L, Miller MW.**(1970). Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action. *Applied Microbiology*. **21**: 456-458.
113. **Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Liden G.** (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **53**:701–8.
114. **Togores, J.H.** (2003), "Tratado de enología", Segundo volumen.
115. **TV UNAM.** (2017, agosto, 19). Vida y bebidas-Sotol. [*Archivo de video*]. Recuperado de: <https://www.youtube.com/watch?v=92OUEyWYaLo>.
116. **USDA Plants Data Base.** <http://plants.usda.gov>
117. **Usseglio-Tomasset L.** (1995). Chimie des fermentations. Chimie Oenologique. 2nd Edition. Laviosier Tec & Doc. France. 387 pp.
118. **Valenzuela-Zapata, A. G..** (1997) El Agave tequilero, su cultivo e industria. Segunda Edición. pp 1-24.
119. **Vandamme, E.J. y Derycke, D.G.,** (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiology*. **29**: 130-176.
120. **Varnam, Alan H. Sutherland P. Jane** (1994). Bebidas Tecnología, Química y Microbiología, Editorial Acriba S.A. Zaragoza España.
121. **Velázquez, C.R.** (1983). El Sotol. Agricultura de zonas áridas. México.
122. **Verdugo Valdez A, Segura Garcia L, Kirchmayr M, Ramírez Rodríguez P, González Esquinca A, Coria R, Gschaedler Mathis A.** (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*. **100**: 497–506.
123. **Voet D., Voet J.G. y Pratt Ch.** (1999). Glucose Catabolism, Fundamentals of biochemistry, Ed. Wiley. USA. Pp. 930
124. **Vardjan T, Mohar Lorbeg P, Rogelj I, Čanžek Majhenič A.** (2013) Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*. **96**: 2729-2736.
125. **Walker, G.M.** (1998). Yeast physiology and biotechnology, John Wiley and Sons (ed.), Chidester. Arkansas. EE.UU.
126. **Wang, N. y Nobel, P.** (1998). Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiol*. **116**: 709-714.

127. **Wimborne, M., Rickard, P** (1978). Pectinolytic Activity of *Saccharomyces fragilis*. Cult in contr. Enviroment.Biotechnology. Bioenginier. **20**: 231-242.
128. **Zárate L. Alejandro** (2002). Poblaciones y su condición: Estudio Regional del Sotol. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Secretaría de Fomento Agropecuario. Gobierno del Estado de Coahuila.
129. **Zinser, E.; Daum, G.**(1996). Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast* **11**: 498-636.

ANEXO

PARTE I

Cálculos

Determinación de la acidez presente en g/L de ácido acético.

Cálculo del porcentaje del consumo de fructosa.

Cálculo del rendimiento de la fermentación.

PARTE II

Cromatogramas

Estándar de inulina

Estándar de fructososacáridos

Muestra

PARTE III

Curvas patrón

Curva patrón para fructosa

Curva patrón etanol

PARTE I

9 Determinación de la acidez presente en g/L de ácido acético.

$$2.3 \text{ mL solución NaOH (gastados)} \times \frac{0.01 \text{ eq NaOH}}{1000 \text{ mL solución NaOH}} \times \frac{1 \text{ eq ac}}{1 \text{ eq NaOH}} \times \frac{60.05 \text{ g ac. acético}}{1 \text{ eq. ac.}}$$
$$= \frac{0.00207184 \text{ g ac.}}{10 \text{ mL muestra}} \times 1000 = 0.14 \frac{\text{g}}{\text{l}} \text{ de ácido acético.}$$

10 Cálculo del porcentaje del consumo de fructosa

Concentración inicial de fructosa: 5.98 mg/mL

Concentración final de fructosa: 1.08 mg/mL

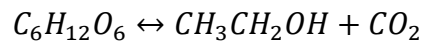
$$5.88 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \rightarrow 100\%$$

$$1.08 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \rightarrow x = 18.36\%$$

$$100 - 18.36 = \mathbf{81.64\%}$$

11 Cálculo del rendimiento de la fermentación

Simplificación del proceso:



fructosa \leftrightarrow *etanol* + *dióxido de carbono*

1 mol de glucosa = 2 moles de etanol

$$1 \text{ mol de glucosa} * \frac{180.16 \text{ g}}{1 \text{ mol de glucosa}} = 180.16 \text{ g}$$

$$2 \text{ moles de etanol} * \frac{46.07 \text{ g}}{1 \text{ mol de etanol}} = 92.14 \text{ g}$$

“Casi la mitad de fructosa se convierte en etanol”

Datos obtenidos mediante HPLC:

Concentración inicial de fructosa: 5.98 mg/mL

Concentración final de etanol: 2.08 mg/mL

Rendimiento teórico:

$$5.98 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ fructosa} \rightarrow \frac{2.99 \text{ mg}}{\text{mL}} \text{ etanol}$$

$$2.99 \frac{mg}{mL} etanol = 100\%$$

Rendimiento real:

$$2.99 \frac{mg}{mL} etanol (Teóricos) \rightarrow 100\%$$

$$2.08 \frac{mg}{mL} etanol (Real) \rightarrow x = 69.5\%$$

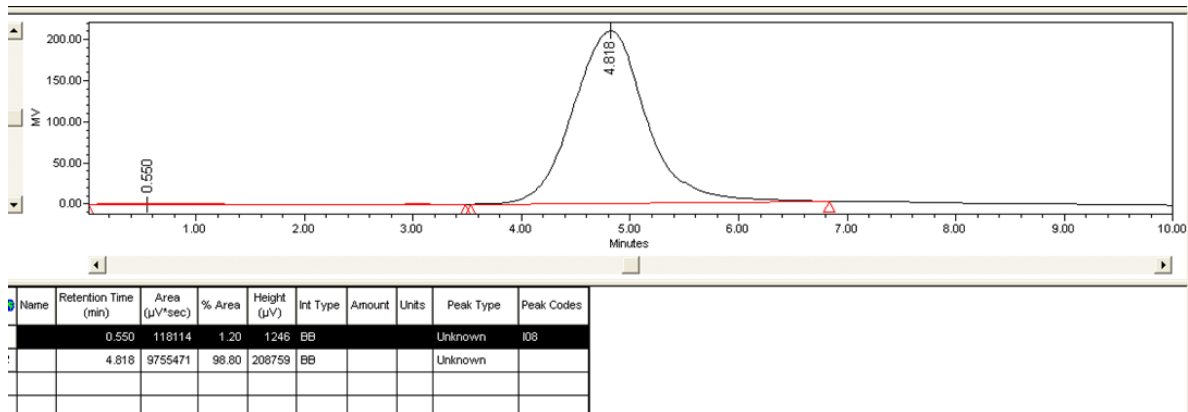
PARTE II

12 Estándares

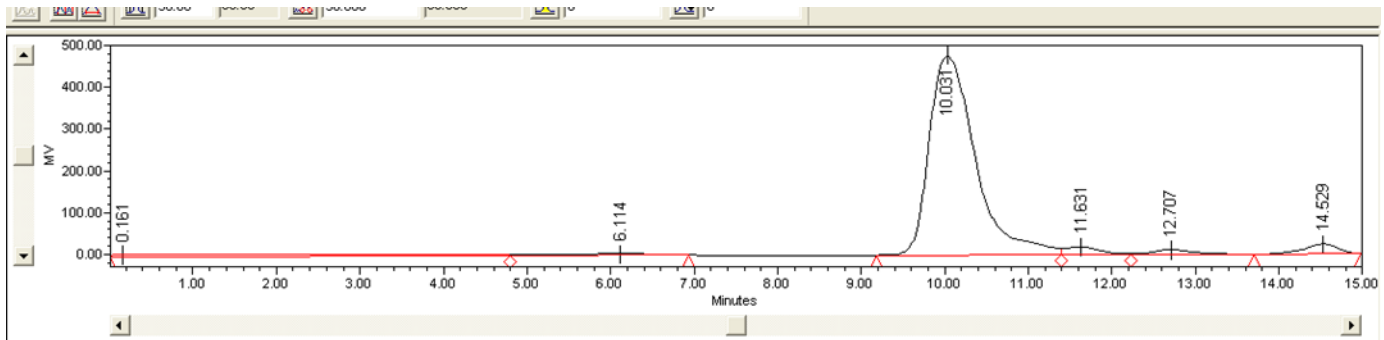
El estándar de inulina (*Agave azul*) apareció a los 4.8 minutos.

Para el estándar de fructosacáridos de *Achicoria* aparecen picos a los 10.03 minutos, 12.07 y a los 14.5 minutos. (Ver cromatograma en el Anexo), se observó este estándar por mera comparación, este estándar viene de una inulina más lineal que la de *Dasyllirion*.

El estándar de inulina (*Agave azul*) apareció a los 4.8 minutos

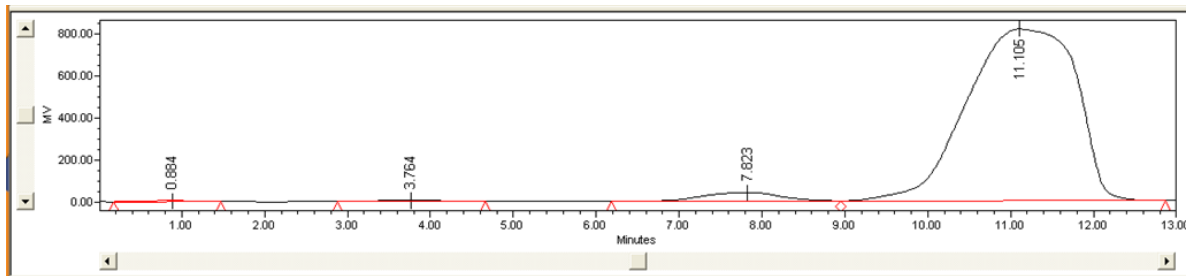


El estándar de fructosacáridos (*chicory*)



Name	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V}^2\text{sec}$)	% Area	Height (μV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1	0.161	965575	4.56	4604	BV			Unknown	
2	6.114	274860	1.30	3823	VB			Unknown	
3	10.031	18271368	86.33	477356	BV			Unknown	
4	11.631	547967	2.59	19426	VV			Unknown	
5	12.707	420422	1.99	12181	VB			Unknown	
6	14.529	684134	3.23	23836	BB			Unknown	

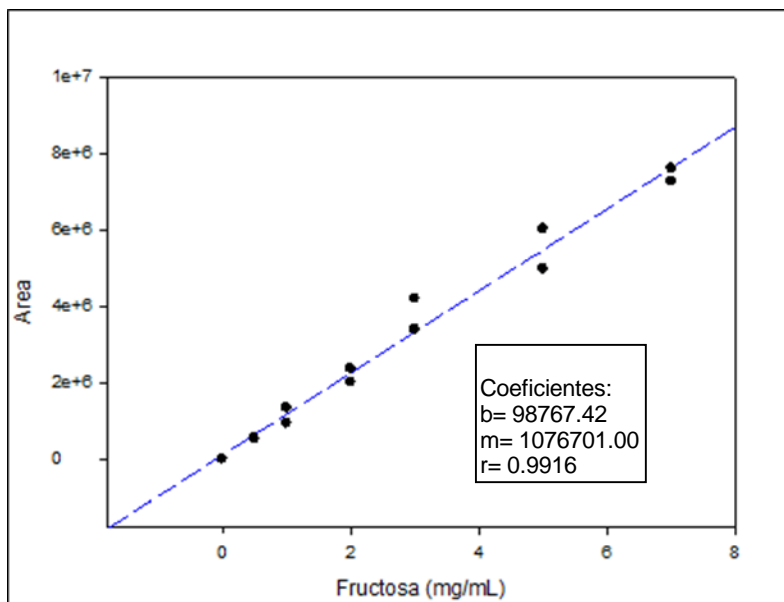
13 Muestra



Name	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V}^2\text{sec}$)	% Area	Height (μV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type	Peak Codes
1	0.884	212483	0.27	6036	BB			Unknown	
2	3.764	345742	0.44	6379	BB			Unknown	
3	7.823	2800827	3.57	42485	BV			Unknown	
4	11.105	75016342	95.71	821021	VB			Unknown	

PARTE III

Curva patrón para fructosa



Curva patrón etanol

