

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



## “ AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS SILVESTRES DE JALISCO DE *Sacharomyces cerevisiae* EN JUGO DE Agave Tequilana Weber.”

### TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

JUAN RAMÓN DURÁN GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. ARMANDO ARIAS GARCÍA

ASESOR DE TESIS:

M.C. RAMÓN RODRÍGUEZ MACÍAS

LAS AGUJAS MPIO. DE ZAPOPAN, JAL. FEBRERO 2003

*S.133*  
*024738*  
*B760*

*g*



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JUAN RAMÓN DURÁN GONZÁLEZ  
P R E S E N T E .**

Manifetamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS SILVESTRES DE JALISCO DE *Sacharomyces cerevisiae* EN JUGO DE Agave Tequilana Weber", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el M.C. ARMANDO ARIAS GARCÍA y como Asesor el M.C. RAMÓN RODRÍGUEZ MACÍAS.

**A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 02 de enero del 2001

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

*Alma Rosa Villalobos*  
**DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. M.C. ARMANDO ARIAS GARCÍA- Director del Trabajo.  
c.c.p. M.C. RAMÓN RODRÍGUEZ MACÍAS.-Asesor del Trabajo.  
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/ARVA/mam\*

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION  
 DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
 PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de  
 Titulación TESIS

que realizó el (la) pasante:

C. JUAN RAMON DURAN GONZALEZ código 090764845 con el

título: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS SILVESTRES DE JALISCO DE

Saccharomyces cerevisiae EN JUGO DE Agave tequilana Weber

consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para  
 autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos  
 la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 1 de Noviembre del 2002.

EL DIRECTOR DEL TRABAJO

EL ASESOR



COORDINACION DE LA CARRERA DE  
 LICENCIADO EN BIOLOGIA

[Firma]  
 NOMBRE Y FIRMA  
 M.C. ARMANDO ARIAS GARCIA

[Firma]  
 NOMBRE Y FIRMA  
 M.C. RAMON RODRIGUEZ MACIAS

SINODALES

- |                                    |                   |                |
|------------------------------------|-------------------|----------------|
| 1.-M.C. CONRADO SOTO VELAZCO       | <u>05/12/02</u>   | <u>[Firma]</u> |
| NOMBRE COMPLETO                    |                   | FIRMA          |
| 2.-M.V.Z. JESUS CASTANEDA SANDOVAL | <u>18-NOV-02</u>  | <u>[Firma]</u> |
| NOMBRE COMPLETO                    |                   | FIRMA          |
| 3.-M.C. FRANCISCO ZAMORA NATERA    | <u>1-NOV-02</u>   | <u>[Firma]</u> |
| NOMBRE COMPLETO                    |                   | FIRMA          |
| 4.-M.C. RAMON RODRIGUEZ MACIAS     | <u>4-NOV-2002</u> | <u>[Firma]</u> |
| NOMBRE COMPLETO                    |                   | FIRMA          |

Este trabajo se realizó dentro del contrato entre la Universidad de Guadalajara con la empresa Tequilas del Señor S. A de C. V. en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, bajo la dirección del M. en B. Armando Arias García y la asesoría del M. en C. Ramón Rodríguez Macías.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir una de mis principales metas en mi vida.

A mi director de tesis Armando Arias por toda su ayuda y tolerancia para sacar este proyecto adelante.

A mi asesor de tesis Ramón Rodríguez por sus sugerencias para este trabajo.

A todos los maestros que aportaron sus conocimientos para que aprendiera algo de esta maravillosa carrera.

A todos los que laboran en el Instituto de Botánica, Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Cultivo de Grana Cochinilla, gracias por su agradable compañía y sincera amistad, especialmente por Silvia, Paty, Jacqueline, Ofelia, Raymundo, Jesús, Ramón, Francisco, Mario, Liberato y Ana Lilia.

A los sinodales por sus comentarios acertados hacia este trabajo.

A todos mis compañeros de generación porque a pesar de las diferencias nos supimos llevar bien.

A todos mis amigos de la carrera por su sincera amistad y por compartir gratos momentos.

A mi Alma Mater que es la Universidad de Guadalajara por darme la oportunidad de desarrollarme en lo que más me gusta en la vida que es la biología.

A todos muchas gracias.

## **DEDICATORIA**

A mis Padres José Guadalupe Durán y Rosa Elia González por haberme dado la vida y una formación personal y profesional.

A mis Hermanos Patricia, José Guadalupe, Víctor y Berenice por su compañía y apoyo incondicional y por que algún día lleguen a realizar todo lo que se propongan en la vida.

# INDICE



BIBLIOTECA CENTRAL  
Pagina

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia de la Industria tequilera	3
2.2 Etapas para la producción del tequila	4
2.3 Tipos de tequila	7
2.4 Fermentaciones alcohólicas con levaduras	8
2.5 Biología de las levaduras	10
2.6 Importancia de las cepas de levaduras	12
3. OBJETIVOS	15
4. HIPÓTESIS	16
5. MATERIALES Y METODOS	17
5.1 Medios de cultivo para el aislamiento de las cepas	17
5.2 Material biológico	17
5.3 Aislamiento de cepas	17
5.4 Crecimiento y fermentación en jugo de agave	18
5.5 Fermentación	19
5.6 Preparación de la curva patrón de etanol	21
5.7 Preparación de la muestra	22
5.8 Selección de cepas para la fermentación	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
6.1 Aislamiento de cepas	24
6.2 Parámetros de crecimiento	25
6.2.1 Tiempo de duplicación en jugo de agave	25
6.2.2 Rendimiento de biomasa en jugo de agave	26
6.3 Parámetros de fermentación	28
6.3.1 Contenido de azúcares en el jugo de agave	28
6.3.2 pH	29
6.3.3 Producción de alcohol	29
6.3.4 Productividad de alcohol	32
6.3.5 Rendimiento de alcohol en jugo de agave	33
6.3.6 Eficiencia en jugo de agave	34
6.4 Selección de cepas	35
6.5 Parámetros de crecimiento y fermentación de las mezclas	36
6.5.1 Contenido de azúcares en el jugo de agave	36
6.5.2 Producción de alcohol de las mezclas de cepas	37
6.5.3 Producción de alcohol de las mezclas en jugo de agave	38
6.5.4 Rendimiento de alcohol en jugo de agave	39
6.5.5 Productividad de alcohol en jugo de agave	40
6.5.6 Eficiencia en jugo de agave	41
7. CONCLUSIONES	42
8. LITERATURA CITADA	43
9. ANEXOS	46

# **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS SILVESTRES DE JALISCO DE *Saccharomyces cerevisiae* EN JUGO DE *Agave tequilana* Weber.**

## **RESUMEN**

Se obtuvieron cinco cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de varios municipios del estado de Jalisco, México. Las cepas AA y AT2 se aislaron a partir de la exposición al aire de medio de cultivo jugo de agave sólido en cajas de petri. La mixta se aisló de una fermentación de medio líquido en un vaso de precipitado bajo las condiciones ambientales del laboratorio. La cepa Amatitan se aisló de un mosto que fue proporcionado por una empresa tequilera de Amatitan y la Pan se obtuvo a partir de crema de levadura para la elaboración de pan.

La caracterización de las cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* consistió en parámetros de crecimiento y de fermentación. El rendimiento de biomasa para las cepas fue 0.512 g/l para la cepa Mixta, 0.44 g/l para la Pan, 0.404 g/l para la AT2, 0.394 g/l para la AA y 0.36 g/l para la Amatitan. La cinética de fermentación de las cepas muestra que a las 44 h se logra la mayor producción de alcohol. De las cepas evaluadas la AA es la que alcanzó la mayor producción de alcohol con  $63.29 \pm 2.61$  g/l, seguida de las cepas PAN, AT2, MIXTA con producciones de  $57.4 \pm 5.31$  g/l,  $53.8 \pm 3.40$  g/l y  $53.4 \pm 3.25$  g/l, respectivamente. La cepa con menor producción de alcohol fue Amatitan con solo  $37.4 \pm 1.95$  g/l. Los rendimientos de alcohol fueron desde  $0.514 \pm 0.021$  g/l para la AA hasta  $0.253 \pm 0.013$  g/l para la Amatitan. La productividad varió desde  $1.438 \pm 0.059$  g·h<sup>-1</sup> hasta  $0.850 \pm 0.044$  g·h<sup>-1</sup>. La eficiencia fue de 99% para la AA, 97% para la AT2, 90% para la Mixta AT2, 76% para pan y 50% para la Amatitan.

Se seleccionaron las cepas AA, MIXTA y AMATITAN para evaluar su comportamiento de fermentación en mostos tequileros con mezclas entre ellas. Las mezclas fueron AA/AMATITAN y AA/MIXTA. La cinética de fermentación de las mezclas AA/AMATITAN presentó una producción de alcohol de 31.5 g/l, mientras que la AA/MIXTA presentó 24.5 g/l. La productividad fue mayor para la mezcla AA/AMATITAN con  $0.773$  g·h<sup>-1</sup> y la AA/MIXTA alcanzo  $0.629$  g·h<sup>-1</sup>. Los rendimientos de alcohol fue mayor para la mezcla AA/AMATITAN con 0.470 g/l, en relación a la AA/MIXTA que alcanzo 0.440 g/l. La eficiencia de la biomasa fue del 88% para la mezcla AA/MIXTA mientras que la AA/AMATITAN alcanzo el 73%.

# 1. INTRODUCCIÓN

El tequila es una bebida asociada con México y particularmente con el estado de Jalisco, donde existen aproximadamente 57 compañías registradas como productoras (Cámara Nacional de la Industria Tequilera, 2002). En estas se producen diferentes tipos de tequilas que difieren principalmente por la proporción del jugo de agave usado como materia prima, el proceso de producción, el microorganismo utilizado en la fermentación, el equipo de destilación, así como el tiempo de maduración y añejamiento (Cedeño, 1995).

El proceso para producir tequila, consta básicamente de 4 pasos que son: el cocimiento de las cabezas de agave, la molienda para extraer el jugo, la fermentación del jugo y la destilación para la separación del tequila del substrato agotado. Durante la fermentación las levaduras juegan un papel importante ya que son ellas las que convierten el azúcar en alcohol con distintos compuestos organolépticos que contribuyen al sabor final del tequila.

La producción de tequila está regulada por el Consejo Regulador del Tequila bajo la norma oficial NOM-006-SCFI-1994 (SECOFI, 1994). Asimismo la Cámara Nacional del Tequila registra, de enero a septiembre del 2002, una producción de tequila de más de 106 millones de litros de tequila  $\approx$  40% alc/vol, de los cuales se exportaron mas de 68 millones de litros equivalentes al 63.9% de la producción total.

El auge de la industria tequilera ha provocado un mayor interés en incrementar la producción para satisfacer la gran demanda que existe, de modo que es necesario optimizar métodos y procesos con el fin de alcanzar mayor eficiencia y productividad, que a su vez nos permitan obtener productos con características organolépticas constantes, que satisfagan las demandas del mercado. Aunque la industria tequilera tiene aproximadamente 200 años de existencia, en algunas casos el atraso tecnológico va más allá de 50 años, por lo

que es frecuente que se produzca un tequila de manera ineficiente y rudimentaria, sin que esto en realidad garantice una alta calidad (Pinal, 1997).

En general las industrias tequileras realizan una fermentación natural del jugo de agave, esto es sin la elaboración de un inóculo con cepas de levaduras con características de crecimiento y de fermentación conocidas. Esto ocasiona que no siempre se obtenga un producto similar en cada lote de fermentación, pues en cada fermentación se utilizan diferentes cepas y/o mezclas de levaduras con otros microorganismos como bacterias, que producen diferentes compuestos organolépticos que dan olor y sabor al tequila, por lo que se presenta una variación constante en la calidad de la bebida alcohólica. Además el tiempo de fermentación es más lento lo que ocasiona un gasto de operación en la empresa. Además se ha reportado que en mezclas de levaduras se obtienen mejores valores en los parámetros de fermentación, tales como el rendimiento de alcohol y eficiencia (Bernal-Abascal *et al.*, 1999).

Es por esto que es de fundamental importancia evaluar las características de crecimiento y de fermentación de cepas de levaduras silvestres de algunas regiones tequileras, así como de mezclas de cepas, para que fermenten jugo de agave. Esto ayudaría a tener bajo control la generación de un producto similar con compuestos organolépticos deseados y evitar los no deseados. Asimismo que se logre producir tequila para satisfacer la demanda del mercado con estándares de calidad bajo los cuales compita con otras bebidas reconocidas internacionalmente.

Cabe hacer notar que este trabajo forma parte de un proyecto de investigación que se está desarrollando para una empresa tequilera del municipio de Tlaquepaque, Jalisco, en donde resulta interesante el aislamiento y la caracterización de las cepas de levaduras a nivel laboratorio para después llevarlas a la planta productora de la empresa y si resultan favorables su utilización posterior en la fabricación del tequila.

## 2. ANTECEDENTES

El tequila es obtenido por la destilación del jugo fermentado del *Agave tequilana* Weber var. azul y está supervisada por el gobierno mexicano bajo la norma oficial NOM-006-SCFI-1994 (SECOFI, 1994). Además, el tequila ostenta denominación de origen, lo cual significa que sólo puede ser nombrado como tal, la bebida alcohólica elaborada con maguey de la especie *Agave tequilana* Weber var. azul y cultivados en el estado de Jalisco, así como algunos municipios de los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas.

### 2.1. Importancia de la industria tequilera

La producción anual de tequila ha tenido un vertiginoso aumento entre los años de 1989 a 1999, pero ha disminuido en el 2000, pasando de 78.5 millones de litros en 1989 a 190.6 millones de litros en 1999 y de 181.6 millones de litros en el 2000, hasta 146.6 millones de litros en el 2001. de enero a septiembre del 2002 se obtuvo una producción de 106 millones de litros, esto se muestra en la figura 1(Cámara Nacional de la Industria Tequilera, 2002).

Es por esto que es de fundamental importancia el desarrollo tecnológico del proceso de producción de tequila, a tal grado de tener bajo control la generación de compuestos deseados y evitar los no deseados, de manera que se logre producir tequila para satisfacer la demanda del mercado y al mismo tiempo que presente estándares de calidad bajo los cuales compita con otras bebidas reconocidas internacionalmente (Pinal, 1997).

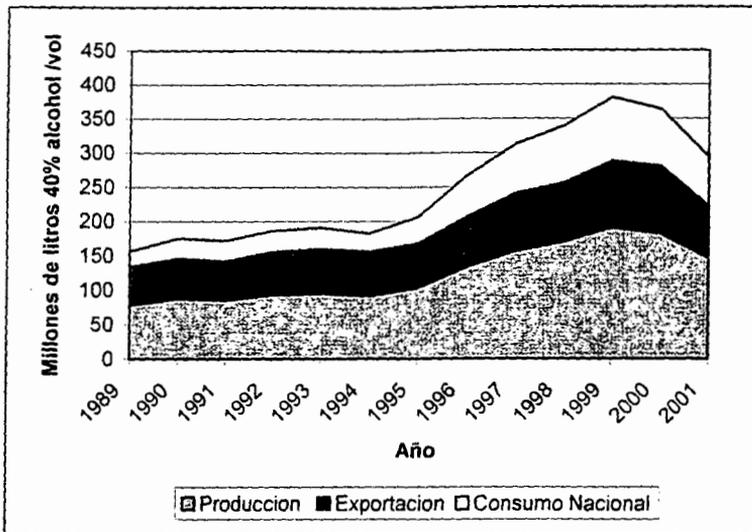


Figura 1. Exportación y consumo nacional de la producción anual de tequila de 1989 a 2001.

## 2.2. Etapas para la producción del tequila

El proceso para producir tequila, consta básicamente de 4 pasos principales que son: cocimiento, molienda, fermentación y destilación (Cedeño, 1995).

### Cocimiento

El cocimiento tiene 3 propósitos:

- a.- Permitir la hidrólisis de la inulina en azúcares libres, principalmente fructosa.
- b.- Caramelización de azúcares para la producción de compuestos que contribuyen al aroma y sabor del tequila.
- c.- Suavizar la consistencia del agave para facilitar la molienda.

El cocimiento se lleva a cabo en hornos y en autoclaves. El cocimiento en hornos es lento y la inyección de vapor se realiza durante 36 h para obtener temperaturas de 100° C, después el vapor es liberado y el agave dejado en el horno durante 2 días más para su completo cocimiento. Enseguida se colecta un

líquido dulce llamado "mieles de cocimiento" para usarse en la formulación del mosto, debido a su alto contenido de azúcares fermentables, para que finalmente el agave cocido se deje enfriar abriendo el horno (Cedeño, 1995).

El cocimiento en autoclaves se realiza inyectando el vapor por 1 h hasta que el vapor condensado lave el agave; así se obtiene un líquido condensado llamado: "mieles amargas", el cual es descargado, ya que tiene un bajo contenido de azúcares fermentables. El vapor se inyecta durante 6 h más para obtener una presión aproximadamente de 1.2 Kg/cm y una temperatura de 121° C. Al finalizar este tiempo el agave permanece en el autoclave, sin vapor adicional, cociéndose lentamente durante 6 h más para obtenerse un jarabe de alta concentración de azúcar para usarse en la formulación del mosto.

#### Molienda

En esta etapa el agave cocido se pasa a través de cuchillos para ser desgarrado, enseguida se pasa por unos molinos, a los cuales se les aplica agua para obtener los azúcares. Este paso genera el subproducto llamado bagazo de maguey tequilero, el cual representa entre el 25 y 40% del total del peso del agave molido, en base del peso húmedo. Este bagazo esta compuesto en porcentaje de base seca por: celulosa, hemicelulosa, lignina, nitrógeno total, pectinas, azúcares solubles y otros compuestos (Cedeño, 1995).

#### Fermentación

Una vez que se formula el mosto con los nutrientes requeridos y se alcanza una temperatura alrededor de los 30° C, se inocula con 5 a 10% del volumen final, con un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, que por lo general son cepas las cuales se utilizan en la panificación y en su mayoría no se encuentran caracterizadas ni mucho menos con un historial de eficiencia de transformación.

La producción de alcohol etílico esta asociado con la formación de compuestos que contribuyen al sabor final del tequila los cuales son: los compuestos organolépticos o sus precursores, entre los que se encuentran el

acetaldehído, lactato de etilo, aldehídos, cetonas, etc. los cuales son producidos en la subsiguiente maduración del mosto antes de pasar a la destilación (Cedeño, 1995).

Existen factores que influyen en la formación de compuestos organolépticos, la cantidad de compuestos organolépticos es menor en las fermentaciones rápidas que en las fermentaciones lentas, es por eso que el sabor y la calidad general del tequila es mejor en los mostos fermentados lentamente (Cedeño, 1995).

La velocidad de fermentación depende principalmente de la cepa de levadura empleada, la composición del mosto y de las condiciones de operación. El contenido de azúcar del mosto disminuye de un valor inicial de 4 a 11 hasta 0.4% (p/v) de azúcares reductores si se emplea una cepa de levadura eficiente, de lo contrario el contenido de azúcares residuales puede ser más alto incrementando los costos de producción (Cedeño, 1995).

La producción de etanol puede ser detectada casi desde el inicio y la disminución del pH de 4.5 a 3.9 es característico de la fermentación. El contenido alcohólico al final de la fermentación oscila entre 4 y 9%(v/v), dependiendo de la concentración inicial de azúcar. La temperatura de fermentación que excede los 40° C, puede causar el final de ésta, teniendo como consecuencia la pérdida de etanol y del sabor, afectando y disminuyendo la calidad del tequila (Cedeño, 1995)

Por otro lado, durante el proceso de fermentación, se utilizan condiciones no asépticas para causar un aumento en la actividad bacteriana. Este aumento depende de diversos factores tales como la velocidad de crecimiento de la levadura durante la propagación de la levadura, la abundancia de la bacteria en la materia prima así como las normas de higiene en la destilería, esta actividad de las bacterias contribuye a las características organolépticas del producto final (Cedeño, 1995).

## Destilación

La destilación consiste en la separación y concentración del mosto fermentado. Además de etanol y otros productos secundarios deseables, el mosto contiene células de levadura agotadas, proteínas, sales minerales y algunos ácidos, así como partículas sólidas de agave, que consisten de celulosa y pectina (Cedeño, 1995).

Existe un gran número de tipos y grados de destilación, siendo los más usados los alambiques y las columnas de rectificación. Los alambiques son considerados la forma más antigua de equipo de destilación. Estos normalmente están hechos de cobre, los cuales fijan compuestos volátiles que contienen azufre, producidos durante la fermentación; además de funcionar como catalizador favorable para las reacciones de los componentes del vino (Léauté, 1990).

### 2.3. Tipos de tequila

El tequila es una bebida tradicional de México con denominación de origen, y en la norma (SECOFI, 1994) se establece que de acuerdo a su elaboración este se clasifica en:

1) Tequila 100% de agave.- Es aquel que se obtiene de los mostos que única y exclusivamente contienen azúcares del jugo de *Agave tequilana* weber var. azul.

2) Tequila.- Es el que proviene de los mostos a los que se les han adicionado hasta un 49% de otros azúcares fermentables tales el azúcar de caña, el piloncillo, las melazas de caña y el jarabe de maíz.

La graduación comercial del tequila es de 38% a 55% sin embargo, de acuerdo a sus características se clasifica en cuatro categorías que son:

a) Tequila blanco (Tipo I). Producto obtenido de la destilación y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

b) Tequila joven abocado (Tipo II). Es un tequila blanco cuyo sabor ha sido matizado, mediante la adición de saborizantes y colorantes inocuos como color

caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina y/o jarabe a base de azúcar, para que de este proceso, la coloración resulte amarillenta.

c) Tequila reposado (Tipo III). Producto que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino, susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

d) Tequila añejo (Tipo IV). Producto sometido a proceso de maduración por lo menos un año en barricas de madera de roble o encino, susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

De esta manera, podemos tener tequila (obtenido a partir de un mosto mixto) blanco, reposado y añejo; así como tequila 100% de los tipos blanco, reposado y añejo, aunque estos productos deben indicar que fueron obtenidos usando sólo agave y elaborados bajo la supervisión del gobierno mexicano.

#### **2.4. Fermentaciones alcohólicas con levaduras**

Las fermentaciones producidas por levaduras intervienen en la elaboración de alimentos como el pan, quesos de maduración externa, productos cárnicos, así como en la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza, los distintos tipos de vino; y en la producción de aditivos, y la obtención de enzimas.

Las levaduras son cuantitativamente y económicamente uno de los grupos más importantes de microorganismos explotados por el hombre con fines comerciales. La importancia de estos reside en su aplicación industrial, para la obtención de productos útiles, debido a las propiedades fermentativas y oxidantes que desarrollan sobre determinados sustratos. Su contribución al progreso del hombre se ha basado ampliamente en su capacidad para producir una rápida y eficiente conversión de azúcares en alcohol y CO<sub>2</sub>.

La fermentación alcohólica es la formación de alcohol etílico a partir de glucosa y otros azúcares como la sacarosa e inulina, por la acción enzimática de microorganismos. Las levaduras son comúnmente utilizados para la producción de

alcohol, debido a su gran capacidad para fermentar azúcares aunque estas difieren ampliamente en su capacidad de tolerancia y producción de alcohol. Por este motivo, el hombre ha empleado a las levaduras desde hace muchos siglos para fermentar zumos de frutas, para esponjar el pan y para hacer sabrosos y nutritivos ciertos productos alimenticios.

En México se producen diversas calidades de alcohol que van desde refinados para usos potables hasta el utilizado como combustible doméstico. Dentro de la demanda a satisfacer se incluye también el consumo para fines sanitarios y para otras ramas de la industria (Blanco y Herryman, 1987).

Actualmente la demanda de alcohol es superior a las posibilidades de suministro, por lo que resulta de gran importancia incrementar los niveles de producción a fin de satisfacer dicha demanda (Maiorella *et al.*, 1984; Blanco y Herryman, 1987).

De acuerdo a Kirk y Othmer (1981); Prescott y Dunn (1976) los procesos empleados en la fabricación de alcohol etílico por fermentación dependen de la naturaleza de la materia prima, y estos pueden ser agrupados en:

- a) Materias primas azucaradas; que contienen una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa como lo son el jugo de caña, las mieles y las melazas.
- b) Materias primas celulósicas como el bagazo, maderas o residuos desechables del procesamiento de la madera, los restos de plantas, etc.
- c) Materias primas ricas en almidón, como la yuca, la papa y el maíz.

La melaza y el jugo de caña son comúnmente empleados para la producción de alcohol por ser fácilmente disponibles y económicos. En los últimos años se han empleado melazas para la fabricación de etanol, esta materia es el jarabe residual del jugo concentrado de azúcar de caña una vez separados los

cristales de azúcar; suelen tener del 48 al 55% de azúcares especialmente sacarosa (Kar y Viswanathan, 1985).

Las levaduras más utilizadas son del género *Saccharomyces*, especialmente las especies *S. cerevisiae* y *S. uvarum* pero, en ciertas ocasiones, se emplean las especies *S. amensis* y *Schizosaccharomyces pombe* (Sturion, 1988).

## 2.5. Biología de las levaduras

La preocupación principal en la obtención de bebidas alcohólicas es la eficacia tecnológica. Las levaduras son organismos heterotróficos que pueden usar azúcares y una variedad de compuestos orgánicos como fuentes de nutrimentos. De estos compuestos ellas obtienen los esqueletos de carbono necesarios para realizar sus diferentes reacciones de biosíntesis (Rose y Harrison, 1971).

Las levaduras, como las bacterias y otras formas de vida, requieren de ciertos materiales nutritivos y condiciones en el medio para un apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios, como por ejemplo: el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, hierro y magnesio. Un suministro adecuado de agua es esencial para que puedan llevar a cabo actividades vitales (Prescott y Gordon, 1962).

Aunque la taxonomía de *Saccharomyces* reviste una gran importancia para la ciencia de la microbiología, la preocupación principal en la obtención de bebidas alcohólicas es la eficacia tecnológica. En la actualidad se conocen alrededor de 39 géneros de levaduras con 400 especies de las cuales las más utilizadas para la producción de etanol son la *Saccharomyces cerevisiae* y *S. carlsbergensis* (Murillo *et al.*, 1984; Concheiro, 1985; Stewart, 1985).

En algunas ocasiones son insignificantes o mínimas las diferencias taxonómicas entre las cepas, pero para los industriales que elaboran cerveza, así como otras bebidas alcohólicas, estas mínimas diferencias son de gran importancia (Varnam y Sutherland, 1994).

La especie *S. cerevisiae* es una levadura ascosporógena que se encuentra en el grupo de los Endomycetales, familia Saccharomycetaceae, subfamilia Saccharomycoideae. La morfología celular depende en alto grado de las condiciones bajo las cuales crecen y se conservan las cepas. Las células de *S. cerevisiae* normalmente son redondas o elipsoidales, oscilan de 1-9 $\mu$  de diámetro y de 2-20 $\mu$  de longitud (Prescot y Gordon, 1962).

Las levaduras forman colonias, las cuales presentan un color blanquecino a amarillento y tiene olores afrutado como manzana, durazno, etc. además presentan refringencia y se reproducen por gemación.

Las levaduras poseen dos formas de reproducción: la sexual y la asexual. La reproducción asexual o vegetativa no se efectúa por medio de órganos especialmente formados, si no que ocurre por formación de blastosporas (gemación), por división transversal (fisión binaria) o por la combinación de los dos procesos (gemaparidad) (Jones *et al.*, 1981).

En el proceso de reproducción sexual, todas las levaduras "verdaderas" producen ascosporas. Por este motivo se incluyen las levaduras verdaderas en el grupo de ascomicetos u hongos con receptáculos o asca. El asca contiene, por lo general, de 1 a 4 esporas pero a veces su número es de 8 o más. Las esporas se producen por divisiones sucesivas del núcleo; cada núcleo así formado se rodea de material citoplásmico, y después por la pared celular (Jones *et al.*, 1981).

*S. cerevisiae* tiene la habilidad de fermentar una amplia variedad de azúcares por ejemplo: sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, maltotriosa, requiere de vitaminas para realizar una función catalítica vital. Las vitaminas deben

por lo menos ser suministradas en el medio o sintetizadas por la misma levadura. Algunas de las vitaminas esenciales son la biotina, la niacina y la riboflavina que son componentes de coenzimas como NAD y FAD; el ácido pantoténico componente de coenzima A y para llevar a cabo reacciones de acetilación; la tiamina funciona como pirofosfato de tiamina en la descarboxilación de piruvato; la piridoxina, ayuda en reacciones de transaminación; el ácido fólico funciona como tetrahidrofolato y la biotina que parece ser la más comúnmente requerida (Jones *et al.*, 1981).

Las cepas *S. cerevisiae* se desarrollan en pH de 2.8 a 8.6, pero el crecimiento óptimo es normalmente entre 4.5 a 6.5. La temperatura de crecimiento se encuentra entre 25° C y 30° C. Una temperatura mayor causa desestabilización de las membranas y un rápido decremento en la viabilidad celular (Phaff *et al.*, 1978; Jones *et al.*, 1981).

## **2.6. Importancia de las cepas de levaduras**

Durante muchos años se ha seleccionado las cepas de levaduras en función de su eficacia y estas difieren de las cepas utilizadas en otros procesos industriales, tales como las de panadería o las cepas de laboratorio (Varnam y Sutherland, 1994). Hay muy pocas diferencias entre las cepas las cuales no llegan a afectar en lo más mínimo desde el punto de vista taxonómico, pero para la elaboración de bebidas alcohólicas estas diferencias suelen ser muy importantes para las industrias tequileras.

Las levaduras originalmente fueron seleccionadas para la elaboración de vino, cerveza, whisky o para la producción de pan por lo que la calidad del tequila obtenido, cuando se utilizan esas levaduras no es satisfactoria y presentan grandes variaciones en el sabor y aroma (Pinal, 1997). Para alcanzar altos rendimientos y mantener una calidad constante en el tequila, algunas fábricas utilizan cepas de levadura aisladas a partir de una fermentación natural de jugo de agave cocido, adicionado con nutrientes y usando condiciones especiales.

Pinal (1990) comparó la producción de alcohol de cuatro cepas de *S. cerevisiae*, a nivel matraces y fermentadores de 15 l y 94 000 l, y encontró que las cepas presentaron un rendimiento de alcohol desde 0.35 g/g hasta 0.45 g/g con eficiencias de fermentación de 68% a 89%. Rodríguez (1990) evaluó la tolerancia a etanol de *S. cerevisiae* y encontró intervalos de tolerancia del 5 al 14% para crecimiento y viabilidad; y para la velocidad de producción de alcohol desde un 4 hasta 18% .

El aislamiento de cepas de *S. cerevisiae* a partir del jugo de agave de diferentes fábricas de tequila del estado de Jalisco presentan diferencias entre las mismas, ya que se ha observado una gran variación en las velocidades máximas de consumo de sustrato y en los parámetros de crecimiento tales como la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo de duplicación (Arellano *et al.*, 1999a).

Por otro lado el tiempo de cocimiento del agave presenta un efecto sobre el crecimiento de la levadura y la producción de etanol, es decir, a un mayor cocimiento se obtiene una disminución en la eficiencia de fermentación y un menor rendimiento de azúcar, esto debido a la presencia de compuestos como el furfural que se genera por la acción del calor sobre los azúcares como la fructosa o la glucosa (Pinal *et al.*, 1999).

La cantidad de inóculo para fermentar el jugo de agave no afecta el rendimiento de alcohol, ya que con una población de  $85 \times 10^6$  cel/ml como mínimo y de  $200 \times 10^6$  cel/ml como máximo en un tiempo de fermentación de 60 h no se encontraron diferencias significativas (Ramírez y Téllez, 1999).

Bernal-Abascal *et al.*, (1999) evaluaron los parámetros de fermentación de dos cepas de levaduras y una mezcla entre ambas en jugo de agave, y encontraron un mayor rendimiento de alcohol y eficiencia en la mezcla que en cada una de las cepas individualmente. El rendimiento de alcohol para las cepas

fue de 0.42 a 0.45 g/g, mientras que en la mezcla se incremento hasta 0.49 g/g. La eficiencia fue de 84% a 89% y para la mezcla fue de 94%.

Así mismo al utilizar mezclas de levaduras se obtiene una mayor concentración de algunos compuestos como son alcoholes superiores, acetaldehído 1-propanol, alcoholes amílicos, lactato de etilo, acetato de etilo e isobutanol. Estos compuestos organolépticos son producidos por cepas de levaduras silvestres, y son los responsables de las propiedades sensoriales y de la calidad del tequila (Bernal-Abascal, *et al.*, 1999).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general:

Aislar y caracterizar cepas de *S. cerevisiae* con capacidad de llevar a cabo una fermentación alcohólica con mostos tequileros.

#### 3.2. Objetivos particulares:

1. Aislar una cepa de levaduras de los municipios de Amatitán, Arandas, Tepatitlán y Zapopan en el estado de Jalisco.
2. Determinar el tiempo de duplicación y el rendimiento de biomasa en jugo de agave de las cepas aisladas.
3. Comparar la productividad, eficiencia, producción y rendimiento de alcohol en jugo de agave de las cepas aisladas.
4. Identificar las cepas con mayor producción de alcohol y de consumo de azúcares en jugo de agave.
5. Comparar los parámetros de crecimiento y de fermentación de dos mezclas de cepas de levaduras.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las cepas de levaduras de (*S. cerevisiae*) aisladas, presentan patrones de crecimiento y de fermentación diferentes de acuerdo a su capacidad de consumo de azúcares y producción de alcohol en jugo de agave.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS



### 5.1. Medios de cultivo para el aislamiento de las cepas

El medio de cultivo para el aislamiento y propagación de las cepas se elaboró en estado sólido con jugo de agave (JAA) ajustado a 8° Bx. Para preparar el medio se adicionó 1g/l de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, se ajustó el pH a 4.5 con ácido sulfúrico y finalmente se agregó 2.5% de agar bacteriológico. Posteriormente se esterilizó a una temperatura de 121° C durante 15 minutos. El medio estéril se vació a cajas de petri con un diámetro de 9 cm. Para la elaboración del medio de fermentación se utilizó jugo de agave ajustado a 12°Bx. Se le adicionó 1g/l de sulfato de amonio y el pH se ajustó a 4.5.

### 5.2. Material biológico

Se utilizaron cinco cepas de *Sacharomyces cerevisiae*: PAN, MIXTA, AMATITAN, AA y AT2, que están depositadas en el cepario del Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara. Se conservan en agar jugo de agave a 4° C.

### 5.3. Aislamiento de cepas

Las cepas de levaduras se aislaron por la exposición de cajas de petri con el medio de cultivo JAA en estado sólido o líquido en los municipios de Arandas, Tepatitlan y/o Zapopan, en el estado de Jalisco. También se aisló una cepa a partir de mosto fermentado de una tequilera en el municipio de Amatitan, Jal. Como control se aisló una cepa a partir de crema de levadura para la elaboración de pan y que La empresa Tequilas del Señor utiliza para elaborar tequila.

Para el aislamiento de las cepas de levaduras por exposición al aire se utilizaron seis cajas con medio de cultivo sólido (JAA), se destaparon durante 5 minutos en terrenos con cultivos de agave en los municipios mencionados, excepto Zapopan. La incubación se realizó a una temperatura ambiente para evitar que hongos filamentosos con una mayor velocidad de crecimiento colonicen el medio y no permitan el crecimiento de levaduras. Cuando se observó crecimiento de levaduras se procedió a la purificación de las cepas mediante resiembras en medio de cultivo fresco.

El aislamiento de cepas de jugo de agave en estado líquido se realizó colocando 50 ml de jugo de agave en un vaso de precipitado de 100 ml en condiciones de laboratorio, después de 48 h de fermentación se inocularon cajas de petri con medio JAA y se incubaron a 28°C hasta que aparecieron colonias de levaduras las que se sembraron en nuevas cajas de petri con medio JAA para la purificación de las cepas.

Con el mosto fermentado de la empresa tequilera de Amatitán y de la crema de levadura de pan, se tomó una asada de cada muestra y se sembró en medio de cultivo sólido de jugo de agave. La incubación se realizó a una temperatura de 28°C, durante 24 h.

Después del aislamiento de las cepas se caracterizaron de acuerdo a su forma, color, olor, tamaño celular, presencia o ausencia de refringencia y si presentan gemación, con la finalidad de seleccionar las adecuadas para la fermentación de mostos tequileros.

#### **5.4. Crecimiento y fermentación en jugo de agave**

Para la caracterización de las cepas y mezclas de cepas en jugo de agave es necesario la determinación de parámetros de crecimiento y de fermentación. El patrón de crecimiento se determinó mediante la siembra con una asa en 100 ml de jugo de agave contenidos en matraces de 250 ml de capacidad. El matraz

permaneció en agitación durante 8 h a 150 rpm. Se determinó la cuenta celular después de la inoculación (tiempo inicial =0 horas) y al final del crecimiento (tiempo final =8 horas) mediante una cámara de Newbauer bajo el microscopio. Para ello la muestra se diluyo en agua destilada a razón de 1:99 con 10 ml del mosto inoculado. Con estos datos se determino el tiempo de duplicación en horas para cada una de las cepas.

#### **5.4.1. Preinoculo**

A un matraz de 250 ml de capacidad se le adicionaron 100 ml de jugo de agave y se esterilizó durante 10 minutos. Ya frío el medio de cultivo se inoculó con una asada de cada cepa. Posteriormente de agito y se tomó una muestra de 5 ml, y se etiquetó como tiempo cero del inoculo. Después de 24 h de incubación a 28°C y en agitación con 200 rpm se tomo otra muestra de 5 ml y se etiquetó como tiempo final . Para ambas muestras se realizó la cuenta celular con una cama Newbauer, previa dilución de la muestra a 1:9 y 1:29 para el tiempo inicial y final, respectivamente.

#### **5.4.2. Rendimiento de biomasa**

Para el rendimiento de biomasa de las cepas evaluadas se tomaron 0.5 ml del jugo de agave de cada cepa en estudio para obtener la producción de biomasa por peso seco. Se utilizaron charolas de aluminio las que se colocaron en una estufa a 60°C durante 24 h y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente se les agrego 0.5 ml del jugo de agave y se colocaron en la estufa a 60°C durante 24 h. Después de este tiempo se volvieron a pesar y por diferencia de peso se determino la producción de biomasa en mg/l .

### **5.5. FERMENTACION**

La fermentación del jugo de agave se realizó en vasos Berzelius de 1000 ml de capacidad, al que se le agregaron 800 ml de jugo de agave con 12° Bx. La inoculación fue con 100 ml de jugo de agave con cada una de las cepas o mezcla de cepas. La fermentación se realizó a 28° C durante 48 y 49 h sin agitación para las cepas y mezclas de cepas, respectivamente. Para cada vaso de fermentación

se tomaron muestras de 20 ml de jugo de agave fermentado a las 0, 4, 20, 24, 28, 44 y 48 h, a partir del inicio de la fermentación (tiempo inicial = 0) y durante las 48 h de fermentación.

A las muestras de jugo de agave fermentado se les determinó el pH, el contenido de azúcares reductores totales y el contenido de alcohol para obtener los rendimientos de fermentación de las cepas y mezclas

### **5.5.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRON PARA AZUCARES RÉDUCTORES**

Se realizó una curva de calibración para determinar azúcares totales por medio del método fenol-sulfúrico, usando una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.1 g/l .

El intervalo de concentraciones a probar fue de 0.01 a 0.1 g/l de sacarosa para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares totales presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

De la solución de sacarosa antes descrita se realizaron diluciones, tomando alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 ml en tubos de ensayo, completando el volumen a 10 ml con agua destilada; estas soluciones tendrán una concentración de 0.01 a 0.1 g l respectivamente. Se le adicionó 1 ml de cada una por duplicado en tubos de ensayo y se determinó los azúcares reductores totales.

### **5.5.2. CONSUMO DE AZUCARES**

Para determinar el contenido de azúcares reductores totales de las muestras fermentadas, estas se diluyen 1:1000. Posteriormente a 1 ml de la dilución se adiciona 1 ml de fenol al 5%, en seguida se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de hidrólisis. Se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agitó y

volumen a 10 ml con agua destilada; estas soluciones tuvieron una concentración de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 g/l respectivamente. Se le adicionó 1 ml de cada una por duplicado en tubos de ensaye y se determinó la concentración de etanol.

## 5.7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra de mosto fermentado se destiló a fin de separar el etanol del jugo de agave fermentado, los destilados se diluyeron dependiendo de la concentración de etanol estimada tomando en cuenta que la curva patrón llega hasta 20 g/l. Generalmente los destilados de las primeras 8 horas de fermentación no fue necesarios de diluir y los de las siguientes horas con una dilución de 1:5 fue suficiente.

A 1 ml de muestra destilada se le agregaron 2 ml de solución de dicromato y se agitó, se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se agregaron 5 ml de agua destilada, se agitó nuevamente y se determinó la absorbancia a 585 nm en el espectrofotómetro.

## 5.8. SELECCIÓN DE CEPAS PARA LA FERMENTACIÓN

Los parámetros de crecimiento y de fermentación que se evaluaron y se utilizaron para la selección de las cepas que conformaron las mezclas fueron:

### 5.8.1 Crecimiento

- Tiempo de duplicación (minutos).
- Rendimiento de biomasa: g biomasa/ g de azúcar en el jugo de agave.
- Cinética de crecimiento.

### 5.8.2 Fermentación

- Consumo de glucosa (g/l).
- pH.
- Producción de alcohol: g/l.
- Productividad (g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).
- Rendimiento de alcohol: g de alcohol/ g de azúcar.
- Cinética del rendimiento de alcohol.
- Eficiencia de fermentación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Aislamiento de cepas

Se aislaron cinco cepas de levaduras en cuatro municipios de Jalisco. El lugar de origen, el tipo de aislamiento y el nombre de cada cepa se muestra en el cuadro 1. Estas cepas presentaron un color de la colonia blanco a excepción de la AT2 que en medio de JAA presento un color de blanco a color café. En la figura 2 se muestra la forma celular de la cepa Mixta y en general fueron redondas a ovaladas con gemación y una zona de refringencia; características típicas de levaduras del genero *Saccharomyces cerevisiae* (Prescot y Gordon, 1962).

Cuadro 1. Lugar de origen y tipo de aislamiento de las cepas de levaduras aisladas en diferentes municipios de Jalisco.

CEPA	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE AISLAMIENTO
PAN	Levadura comercial para elaborar pan	Siembra de estrias en JAA
MIXTA	Jugo de agave fermentado en Zapopan	Exposición al aire de mosto
AMATITAN	Jugo fermentado de tequilera de Amatitan	Siembra de estrias en JAA
AA	Cultivos de Agave en Arandas	Exposición al aire de medio JAA
AT2	Cultivos de Agave en Tepatitlan	Exposición al aire de medio JAA

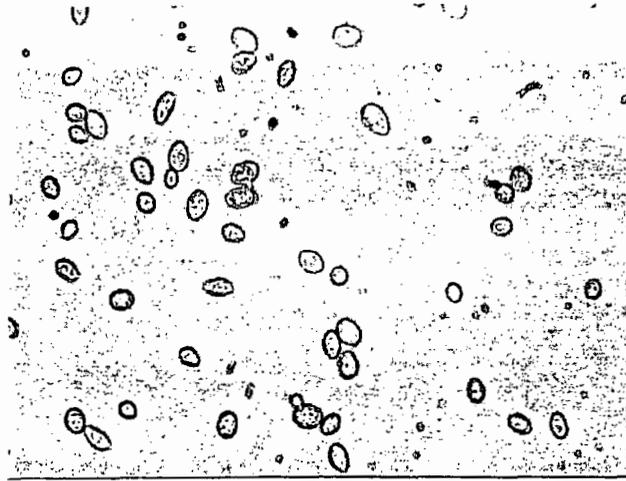


Figura 2. Morfología de la cepa de levadura Mixta aislada en jugo de agave.

## 6.2. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

### 6.2.1. Tiempo de duplicación en jugo de agave

El tiempo de duplicación de las cinco cepas de levaduras se presenta en la figura 3. La cepa PAN presentó el mayor tiempo de duplicación con 182 minutos, le siguieron las cepas AT2, AA, MIXTA con 125, 68, 67 minutos respectivamente y finalmente la cepa AMATITAN con 64 minutos.

Las cepas de *S. cerevisiae* presentan tiempos de duplicación de 90 minutos en medio YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa) y de 140 minutos en medios sintéticos (Sherman, 2000). En jugo de agave a 8° Brix, y a una temperatura de 30° C, se han reportado tiempos de duplicación muy variado desde 60 hasta 249 minutos (Arellano *et al.*, 1999).

Al comparar los tiempos de duplicación de las cepas aisladas en este trabajo con los reportados en la bibliografía, se consideraron a las cepas PAN y

AT2 son de crecimiento lento mientras que la AA, MIXTA y AMATITAN presentan un crecimiento rápido.

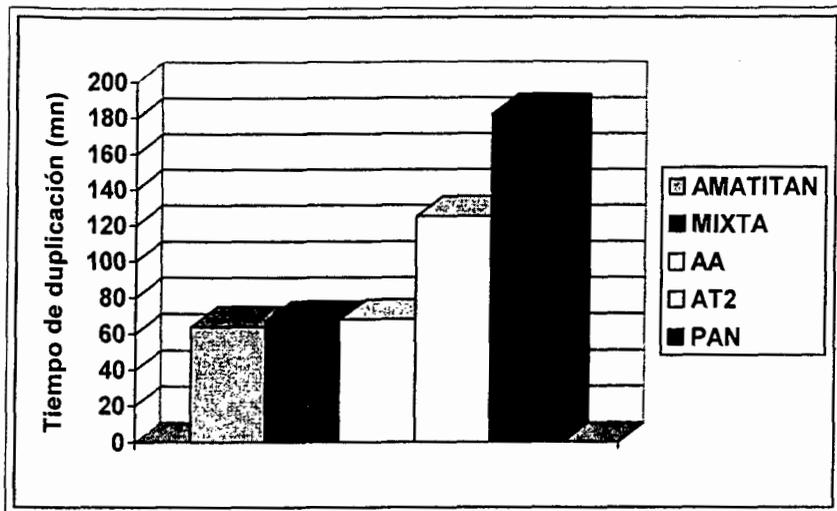


Figura 3. Tiempo de duplicación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Jalisco en medio de jugo de agave.

### 6.2.2 Rendimiento de biomasa en jugo de agave

El rendimiento de biomasa en jugo de agave de las cepas aisladas se presenta en la figura 4. La cepa MIXTA presentó el mayor rendimiento de biomasa con 0.51g/g, le siguió la PAN con 0.44 g/g, AT2 con 0.40 g/g, AA con 0.40 g/g, la cepa con menor rendimiento de biomasa fue la AMATITAN con 0.36 g/g.

Los rendimientos de biomasa de las cepas obtenidas en este trabajo resultaron bajos, ya que Arellano *et al* (1999a) evaluaron el rendimiento de biomasa de 12 cepas de levaduras nativas del estado de Jalisco (Tequila, Guadalajara y Los Altos) en jugo de agave con 12 °B, y obtuvieron valores desde 0.054 hasta 0.092g/g, pero encontraron una cepa con 0.260 g/g. Por otro lado, en

se tomaron muestras de 20 ml de jugo de agave fermentado a las 0, 4, 20, 24, 28, 44 y 48 h, a partir del inicio de la fermentación (tiempo inicial = 0) y durante las 48 h de fermentación.

A las muestras de jugo de agave fermentado se les determinó el pH, el contenido de azúcares reductores totales y el contenido de alcohol para obtener los rendimientos de fermentación de las cepas y mezclas

### **5.5.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRON PARA AZUCARES REDUCTORES**

Se realizó una curva de calibración para determinar azúcares totales por medio del método fenol-sulfúrico, usando una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.1 g/l .

El intervalo de concentraciones a probar fue de 0.01 a 0.1 g/l de sacarosa para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares totales presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

De la solución de sacarosa antes descrita se realizaron diluciones, tomando alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 ml en tubos de ensayo, completando el volumen a 10 ml con agua destilada; estas soluciones tendrán una concentración de 0.01 a 0.1 g l respectivamente. Se le adicionó 1 ml de cada una por duplicado en tubos de ensayo y se determinó los azúcares reductores totales.

### **5.5.2. CONSUMO DE AZUCARES**

Para determinar el contenido de azúcares reductores totales de las muestras fermentadas, estas se diluyen 1:1000. Posteriormente a 1 ml de la dilución se adiciona 1 ml de fenol al 5%, en seguida se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado con el pipeteador en forma brusca para conseguir el efecto de hidrólisis. Se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agitó y

enseguida se sometió a baño de agua durante 10 minutos. Finalmente se determinó la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro (Dubois *et al.*, 1956).

### **5.5.3. PRODUCCIÓN DE ALCOHOL**

Para la determinación del contenido de alcohol, primero se separaron los productos de riqueza alcohólica del jugo de agave fermentado. En un matraz aforado de 50 ml se agregaron 10 ml del mosto fermentado y 10 ml de agua destilada. Se aplicó calor con una placa térmica para que los alcoholes se evaporaran y mediante un refrigerante estos se condensaron en un tubo de ensaye. Con esto se separo el contenido de alcoholes del substrato agotado y posteriormente se determinó el contenido de alcohol.

El contenido de alcohol se determinó mediante la técnica espectrofotométrica del dicromato de potasio (Bohringer y Jacob, 1964). Para ello se preparó una solución con 33.768 g de dicromato de potasio, 325 ml de ácido sulfúrico y 1000 ml de agua destilada. Se diluyó el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se dejó enfriar y se le agregó el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada; se aforo con agua destilada a 1000 ml.

### **5.6. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRON DE ETANOL**

Para elaborar una curva patrón de alcohol etílico se preparó una solución de alcohol etílico. De acuerdo con la densidad y el porcentaje de pureza del etanol, se calculó el volumen que es necesario adicionar a 1 litro de agua destilada para obtener una solución de 20 g/l (si la densidad es de 0.081, con una pureza de 99.6%, se miden 2.5 ml de etanol absoluto y se afora con agua destilada a 100 ml).

De la solución de etanol antes descrita se realizaron diluciones, tomando alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 ml en tubos de ensayo, completando el

volumen a 10 ml con agua destilada; estas soluciones tuvieron una concentración de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 g/l respectivamente. Se le adicionó 1 ml de cada una por duplicado en tubos de ensaye y se determinó la concentración de etanol.

## **5.7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

La muestra de mosto fermentado se destiló a fin de separar el etanol del jugo de agave fermentado, los destilados se diluyeron dependiendo de la concentración de etanol estimada tomando en cuenta que la curva patrón llega hasta 20 g/l. Generalmente los destilados de las primeras 8 horas de fermentación no fue necesarios de diluir y los de las siguientes horas con una dilución de 1:5 fue suficiente.

A 1 ml de muestra destilada se le agregaron 2 ml de solución de dicromato y se agitó, se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se agregaron 5 ml de agua destilada, se agitó nuevamente y se determinó la absorbancia a 585 nm en el espectrofotómetro.

## **5.8. SELECCIÓN DE CEPAS PARA LA FERMENTACIÓN**

Los parámetros de crecimiento y de fermentación que se evaluaron y se utilizaron para la selección de las cepas que conformaron las mezclas fueron:

### **5.8.1 Crecimiento**

- Tiempo de duplicación (minutos).
- Rendimiento de biomasa: g biomasa/ g de azúcar en el jugo de agave.
- Cinética de crecimiento.

### 5.8.2 Fermentación

- Consumo de glucosa (g/l).
- pH.
- Producción de alcohol: g/l.
- Productividad (g alcohol  $l^{-1} h^{-1}$ ).
- Rendimiento de alcohol: g de alcohol/ g de azúcar.
- Cinética del rendimiento de alcohol.
- Eficiencia de fermentación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Aislamiento de cepas

Se aislaron cinco cepas de levaduras en cuatro municipios de Jalisco. El lugar de origen, el tipo de aislamiento y el nombre de cada cepa se muestra en el cuadro 1. Estas cepas presentaron un color de la colonia blanco a excepción de la AT2 que en medio de JAA presento un color de blanco a color café. En la figura 2 se muestra la forma celular de la cepa Mixta y en general fueron redondas a ovaladas con gemación y una zona de refringencia; características típicas de levaduras del genero *Saccharomyces cerevisiae* (Prescot y Gordon, 1962).

Cuadro 1. Lugar de origen y tipo de aislamiento de las cepas de levaduras aisladas en diferentes municipios de Jalisco.

CEPA	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE AISLAMIENTO
PAN	Levadura comercial para elaborar pan	Siembra de estrias en JAA
MIXTA	Jugo de agave fermentado en Zapopan	Exposición al aire de mosto
AMATITAN	Jugo fermentado de tequilera de Amatitan	Siembra de estrias en JAA
AA	Cultivos de Agave en Arandas	Exposición al aire de medio JAA
AT2	Cultivos de Agave en Tepatitlan	Exposición al aire de medio JAA

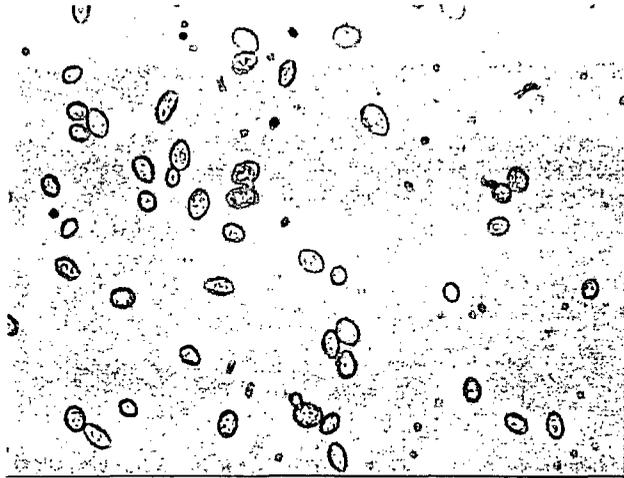


Figura 2. Morfología de la cepa de levadura Mixta aislada en jugo de agave.

## 6.2. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

### 6.2.1. Tiempo de duplicación en jugo de agave

El tiempo de duplicación de las cinco cepas de levaduras se presenta en la figura 3. La cepa PAN presentó el mayor tiempo de duplicación con 182 minutos, le siguieron las cepas AT2, AA, MIXTA con 125, 68, 67 minutos respectivamente y finalmente la cepa AMATITAN con 64 minutos.

Las cepas de *S. cerevisiae* presentan tiempos de duplicación de 90 minutos en medio YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa) y de 140 minutos en medios sintéticos (Sherman, 2000). En jugo de agave a 8° Brix, y a una temperatura de 30° C, se han reportado tiempos de duplicación muy variado desde 60 hasta 249 minutos (Arellano *et al.*, 1999).

Al comparar los tiempos de duplicación de las cepas aisladas en este trabajo con los reportados en la bibliografía, se consideraron a las cepas PAN y

AT2 son de crecimiento lento mientras que la AA, MIXTA y AMATITAN presentan un crecimiento rápido.

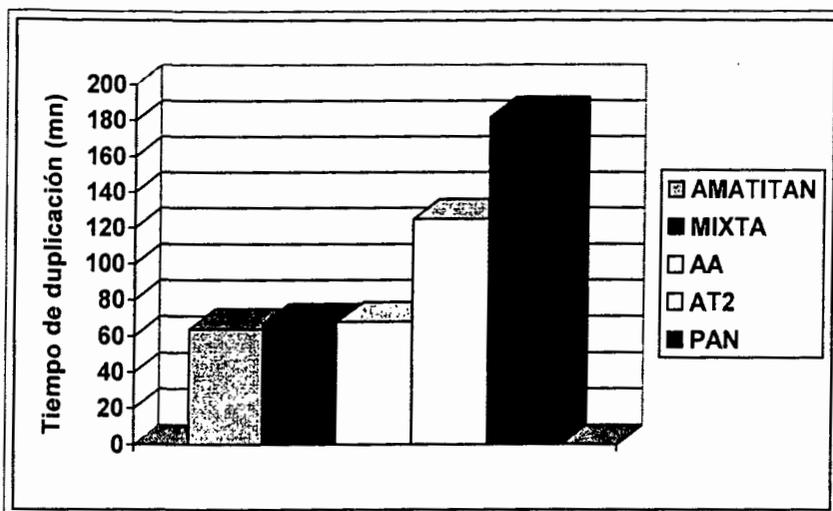


Figura 3. Tiempo de duplicación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de Jalisco en medio de jugo de agave.

### 6.2.2 Rendimiento de biomasa en jugo de agave

El rendimiento de biomasa en jugo de agave de las cepas aisladas se presenta en la figura 4. La cepa MIXTA presentó el mayor rendimiento de biomasa con 0.51g/g, le siguió la PAN con 0.44 g/g, AT2 con 0.40 g/g, AA con 0.40 g/g, la cepa con menor rendimiento de biomasa fue la AMATITAN con 0.36 g/g.

Los rendimientos de biomasa de las cepas obtenidas en este trabajo resultaron bajos, ya que Arellano *et al* (1999a) evaluaron el rendimiento de biomasa de 12 cepas de levaduras nativas del estado de Jalisco (Tequila, Guadalajara y Los Altos) en jugo de agave con 12 °B, y obtuvieron valores desde 0.054 hasta 0.092g/g, pero encontraron una cepa con 0.260 g/g. Por otro lado, en

medios de cultivo sintéticos elaborados con sacarosa como fuente de carbono, el rendimiento de biomasa de *S. cerevisiae* es de 0.075 g/g (Atiyeh y Duvnjak, 2001).

Los bajos rendimientos de biomasa de las cepas aisladas, en comparación a los reportados en la literatura se pueden explicar porque las condiciones de crecimiento fueron diferentes, es decir, una mayor temperatura de crecimiento de 35 °C y una mayor concentración de azúcares de hasta 257g/l.

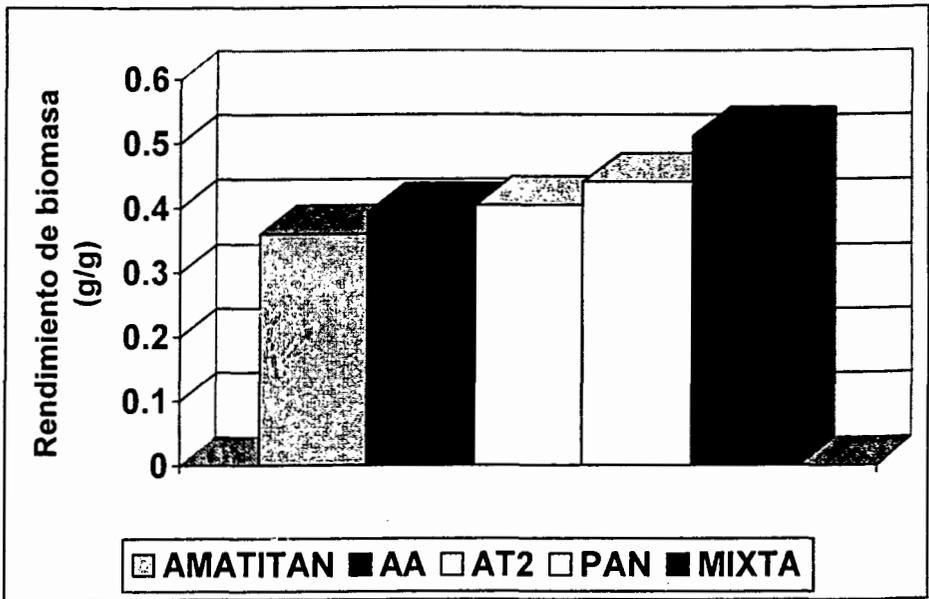
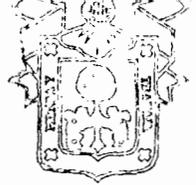


Figura 4. Rendimiento de la biomasa de las cepas de levaduras aisladas en Jalisco en jugo de agave.



### 6.3. PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN

#### 6.3.1. Contenido de azúcares en el jugo de agave

El contenido de azúcares en el jugo de agave para la fermentación con las cepas de levaduras aisladas en Jalisco se muestran en la figura 5. Al inicio de la fermentación este varío desde 108 g/l para la AT2 hasta 147g/l para la cepa AMATITAN. Asimismo se observa que el consumo inició a las 4 h de fermentacion y despues disminuye el contenido de azúcar hasta las 44 h para despues mantenerse en niveles bajos.

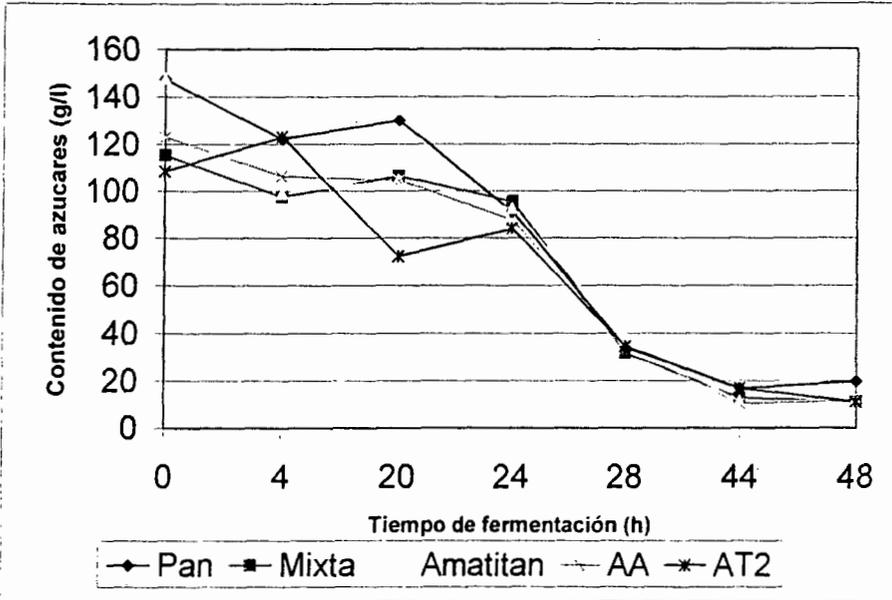


Figura 5. Contenido de azúcares de las cepas de levaduras aisladas en Jalisco en jugo de agave.

### 6.3.2 pH

En la figura 6 se muestra la cinética de pH durante las 48 horas de fermentación del jugo de agave con cada una de las cepas. Al inicio de la fermentación el pH fue de 4.3 mientras que a las 48 h disminuye hasta 3.9, producto de la fermentación, dichos valores siguen la misma tendencia con lo reportado por Santos (1990).

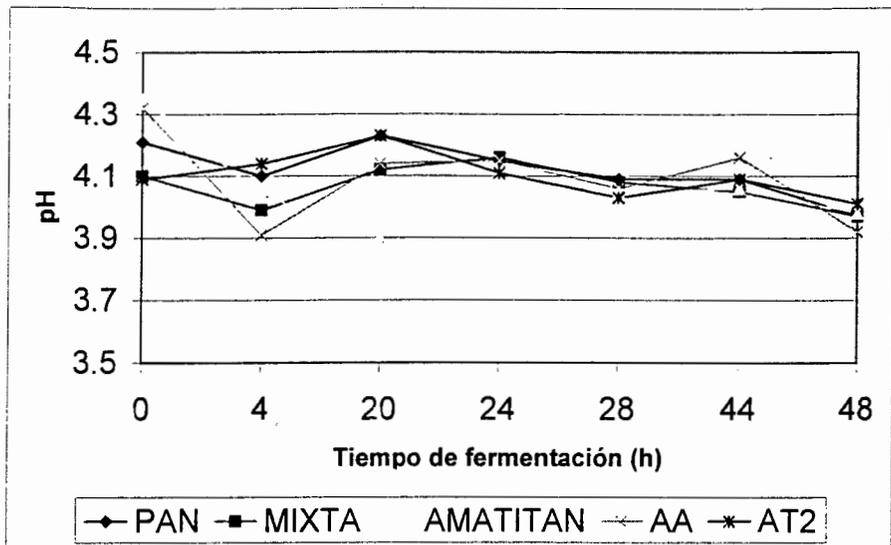


Figura 6. pH de las cepas de levaduras aisladas en Jalisco a las 48 h de fermentación del jugo de agave.

### 6.3.3. Producción de alcohol

En la figura 7 se muestra la cinética de producción de alcohol de las cinco cepas de levaduras aisladas. Se observa una fase de adaptación o latencia de 4 h y una fase exponencial que dura 40 h desde las 4 h hasta 44 h de fermentación. La mayor producción de alcohol se observó a las 44 h y a las 48 h de fermentación se encontró una disminución del contenido de alcohol, esto por la disminución en la viabilidad celular de las cepas a las 44 h (Gough y Mc Hale, 1998).

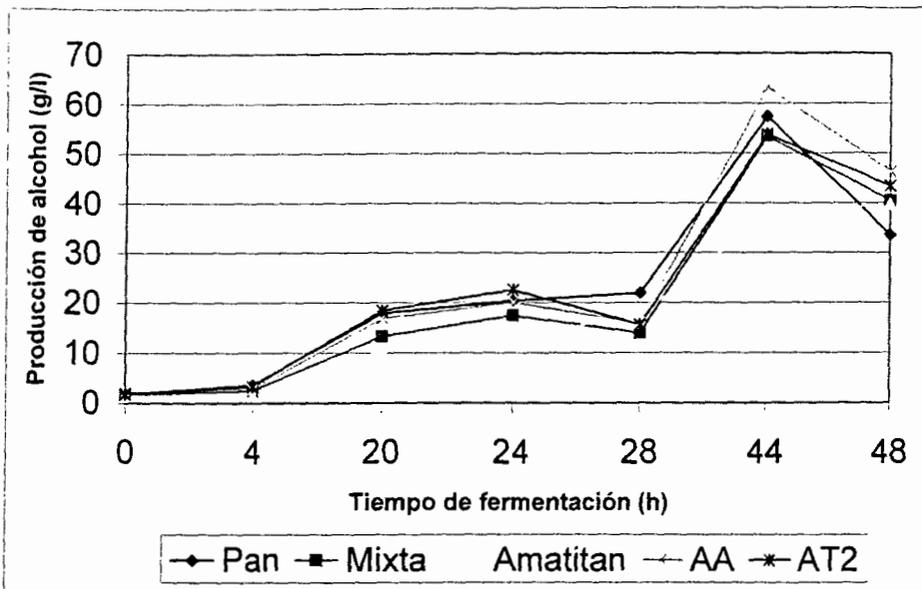


Figura 7. Producción de alcohol de las cepas de levaduras aisladas en Jalisco.

En la figura 8 se muestra la producción de alcohol de las cepas a las 44 h de fermentación. Se observa que la cepa AA presentó la mayor producción de alcohol con 63 g/l, seguida de las cepas PAN, AT2 y MIXTA con 57, 53, 53 g/l. La menor producción de alcohol fue para AMATITAN con 37 g/l.

Las cepas evaluadas en este estudio presentaron menores rendimientos de alcohol, ya que Nigam *et al.*, (1998) reportaron una concentración máxima de alcohol de 94.9 g/l, en caña de melaza, un pH de 4.5 y una temperatura de 30° C y 255 g/l de azúcar; sin embargo, concuerda con los datos obtenidos en otros substratos. Algunos de ellos son sacarosa, fructosa y glucosa con 74, 73, 72 g/l y una temperatura de fermentación de 30° C, mientras que a 40 °C disminuye a 64, 61 y 63 g/l (Kiransree *et al.*, 2000), y con almidón soluble es de 50 g/l (Kondo *et al.*, 2002).

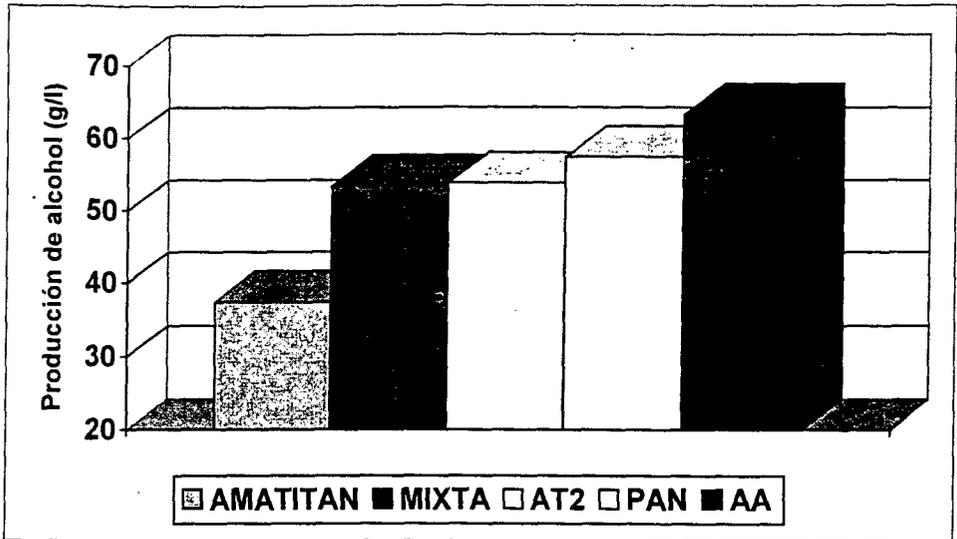


Figura 8. Producción de alcohol en jugo de agave de las cepas de levaduras aisladas.

En sustratos naturales como el jugo de *Opuntia ficus-indica* la producción de alcohol es de 55.3 ml/l (Turker, *et al.*, 2001). Mientras que con la fermentación en estado sólido de vainas secas de algarrobo se obtienen 160 g/kg (Roukas, 1994a), y con los extractos en matraz agitado es de 65 g/l (Roukas, 1994b). En melazas al 14% de azúcar es de 53.2 g/l y de 45 g/l a 30°C y 40°C (Kiransree *et al.*, 2000). Por otro lado, al fermentar inulina a 30 °C con *Aspergillus niger* durante 120 h y posteriormente 15 h con *S. cerevisiae* se ha obtenido una producción de alcohol de 21% (vol/vol) (Ohta *et al.*, 1993). Y con el jugo de agave se ha obtenido una producción de alcohol de 34.89 y 34.90 g/l respectivamente con una temperatura de 35° C, un pH de 4.5, y con 72 h de fermentación (Bernal-Abascal *et al.*, 1999; Arellano *et al.*, 1999b).

### 6.3.4 Productividad de alcohol

La productividad de las cinco cepas de levaduras durante 44 h de fermentación en jugo de agave se muestra en la figura 9. La mayor productividad se observó a las 44 h de fermentación al igual que la producción de alcohol. La cepa con mayor productividad fue la cepa AA con 1.43 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, seguida de PAN, AT2, MIXTA con 1.30, 1.22 y 1.21 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, y la AMATITAN hasta 0.85 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

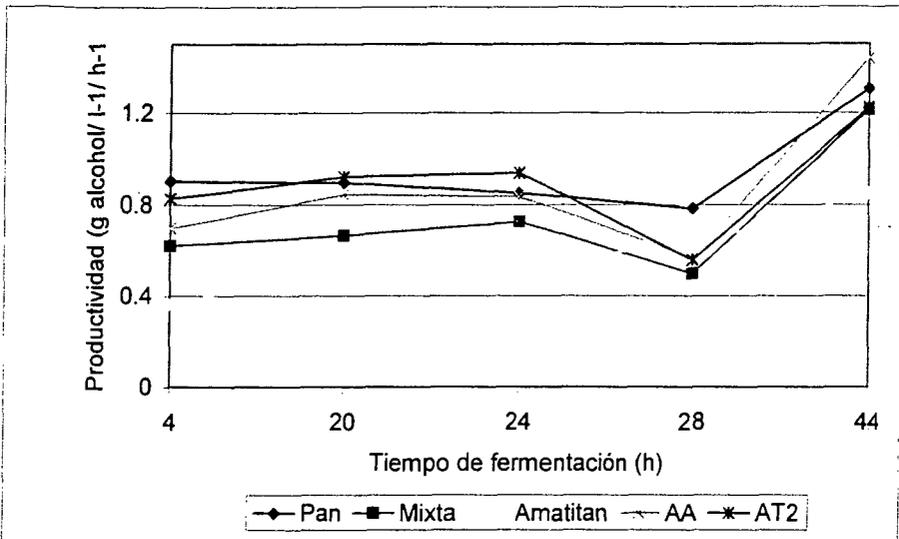


Figura 9. Productividad de alcohol de las cepas de levaduras aisladas en Jalisco a las 44 h de fermentación del jugo de agave.

La productividad de las cepas aisladas en jugo de agave concuerda con lo reportado para otras cepas y sustratos tales como el almidón soluble, jugo de la caña de azúcar y melaza (Kondo *et al.*, 2002, Abate *et al.*, 1996 y Nigam *et al.*, 1998) con valores que van de 0.71 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 1.5 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y 0.58 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Sin embargo, es menor a la obtenida en un medio sintético con sacarosa, inulina, extracto de vainas de algarrobo y melaza, en donde se obtuvo una productividad de 2.23 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 6.2 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 8.3 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y

10.5 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente (Atiyeh y Duvnjak, 2001; Ohta *et al.*, 1993; Roukas, 1994b; Koutinas *et al.*, 1991). Cabe resaltar que se han obtenido productividades de hasta 27.3 g alcohol l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en glucosa pero en otras condiciones de fermentación, es decir en un tanque alimentado (Margaritis y Wilke, 1978).

### 6.3.5 Rendimiento de alcohol en jugo de agave

La figura 10 muestra el rendimiento de alcohol en jugo de agave de las cinco cepas de levaduras aisladas. La cepa con el mayor rendimiento de alcohol fue AA con 0.52 g/g, seguida de AT2, MIXTA y PAN con 0.49, 0.46 y 0.38 g/g, y finalmente AMATITAN con 0.25 g/g. Estos resultados se encuentra en niveles reportados para otras cepas y substratos, en donde se han obtenido valores de 0.429 y 0.454 g/g en jugo de agave (Bernal-Abascal *et al.*, 1999), 0.44 g/g en extractos de vainas de algarrobo en un sistema agitado (Roukas, 1994b) y de 0.43 g/g en melaza (Nigam *et al.*, 1998).

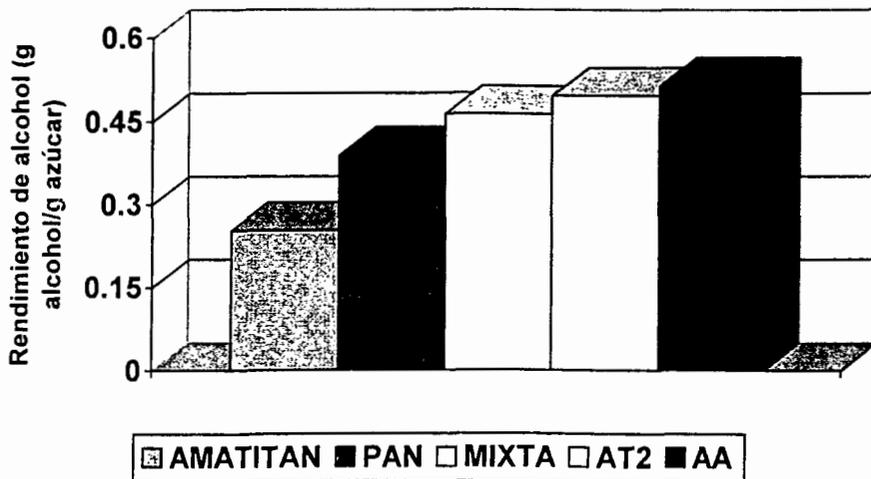


Figura 10. Rendimiento de alcohol en jugo de agave de las cinco cepas de levaduras aisladas.

### 6.3.6 Eficiencia en jugo de agave

La figura 11 muestra la eficiencia de las cinco cepas de estudio en jugo de agave, en donde se observa que las cepas AA, AT2 y MIXTA presentaron la mayor eficiencia con 99, 97 y 90%. Le siguió la cepa PAN con 76% y la menor eficiencia fue para la AMATITAN con 50%.

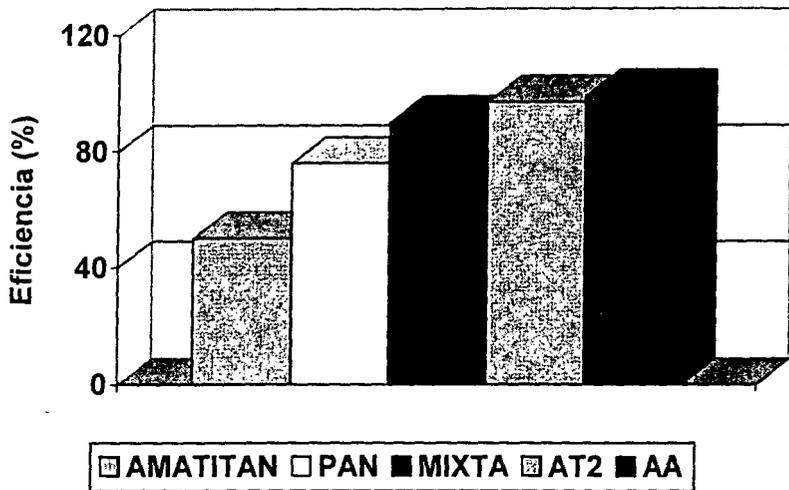


Figura 11. Eficiencia de las cinco cepas de levaduras en jugo de agave

Las cepas AA, AT2 y MIXTA presentan mayores eficiencias que las reportadas en la literatura, ya que se registran valores menores de 89% (Arellano *et al.*, 1999; Bernal-Abascal *et al.*, 1999; Roukas, 1994a; Ohta *et al.*, 1993), y son semejantes a las obtenidas en extracto de vaina de algarroba con 95%, pero el substrato inicial cuenta con 200 g/l de azúcar fermentable (Roukas, 1994b).

#### 6.4 Selección de cepas

La constante producción de tequila con buena calidad requiere de la elaboración de inóculo con una cepa de levadura para cada lote de fermentación. Esto permitiría la producción de los mismos metabolitos en las diferentes fermentaciones y por consiguiente un tequila con las mismas características organolépticas.

La producción de tequilas con olores y sabores atractivos para el mercado requiere la fermentación de jugos de agave por medio de cepas de levaduras que produzcan diferentes metabolitos organolépticos. Sin embargo, una sola cepa presenta perfiles de compuestos organolépticos limitado por lo que es necesario la fermentación de jugo de agave con mezclas de cepas para que se incremente el número y la cantidad de estos compuestos, pero que mantengan rendimientos adecuados para la industria (Gill, *et al.*, 1996).

Para iniciar un programa de producción de tequilas con diferentes olores y sabores, es necesario caracterizar las cepas individualmente y posteriormente la evaluación de mezclas para que se mantengan las condiciones óptimas de crecimiento y fermentación, sin disminuir los rendimientos de alcohol.

La selección de las cepas fue de acuerdo a los parámetros de crecimiento y fermentación, por lo que las cepas fueron MIXTA y AMATITAN, que presentaron un tiempo de duplicación menor y mayor rendimiento de biomasa y la cepa AA por su producción de alcohol. Con estas tres cepas se evaluaron los parámetros de fermentación de las mezclas AA/AMATITAN y AA/MIXTA en una proporción del 50%.

## 6.5 Parámetros de crecimiento y fermentación de las mezclas

### 6.5.1 Contenido de azúcares en el jugo de agave

En la figura 12 se observa el contenido de azúcares en el jugo de agave que se utilizó para la fermentación con las dos mezclas de levaduras. El contenido de azúcar al inicio de la fermentación fue de 115 g/l para la AA/MIXTA y de 154 g/l para la AA/AMATITAN. El mayor consumo de azúcar inició a las 22 h de fermentación, el cual se mantuvo de las 42 hasta las 49 h.

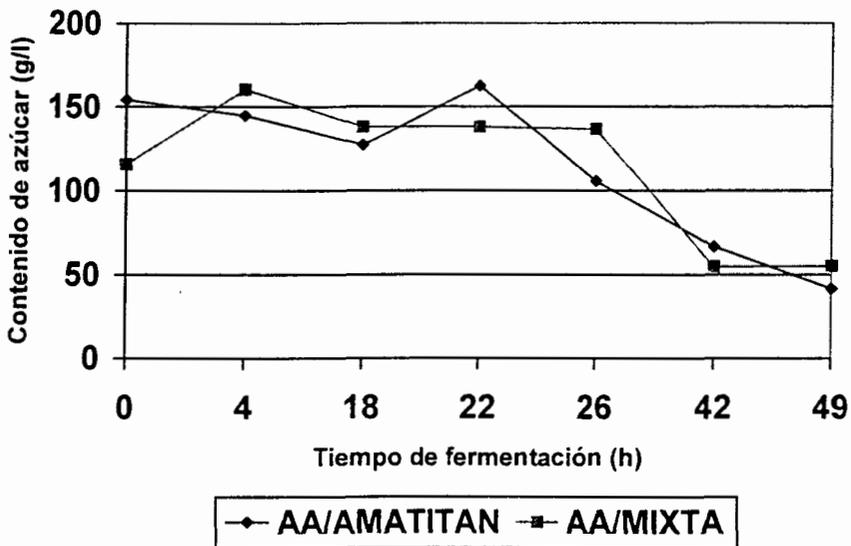


Figura 12. Contenido de azúcares en el jugo de agave para la fermentación con las dos mezclas de levaduras.

### 6.5.2 Producción de alcohol de las mezclas de cepas

En la figura 13 se presenta la producción de alcohol en jugo de agave de las dos mezclas evaluadas. Durante 49 h de fermentación se observa una etapa de latencia en las primeras 4 h de la fermentación y posteriormente una fase logarítmica que se mantiene hasta las 42 h, y finalmente una disminución drástica hasta llegar a valores inferiores a 5 g/l. Este decremento en el contenido de alcohol puede ser debido a una disminución drástica del número de células viables (Gough y Mc Hale, 1998).

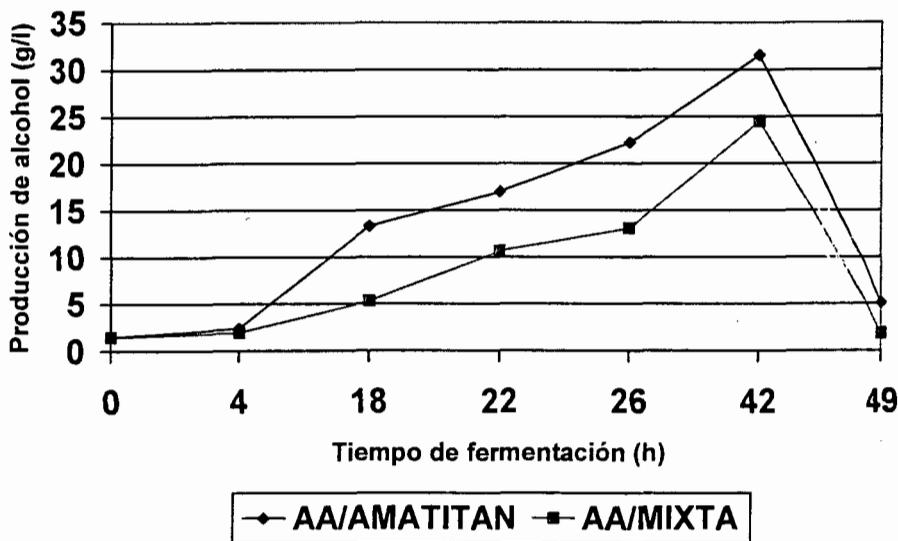


Figura 13. Producción de alcohol de las dos mezclas de levaduras en jugo de agave.

### 6.5.3 Producción de alcohol de las mezclas en jugo de agave

La producción de alcohol de las dos mezclas de levaduras evaluadas en jugo de agave a las 42 h de fermentación, se muestra en la figura 14, y se observa que la AA/AMATITAN presentó los valores mas altos con 31.5 g/l y la AA/MIXTA con 24.5 g/l. Estos son similares a los 34.9 g/l reportados para una mezcla de dos cepas de levaduras en jugo de agave a las 72 h de fermentación. Sin embargo, son menores a los obtenidos con cada cepa en forma individual, lo que indica una posible inhibición de cepas (Bernal-Abascal *et al.*, 1999).

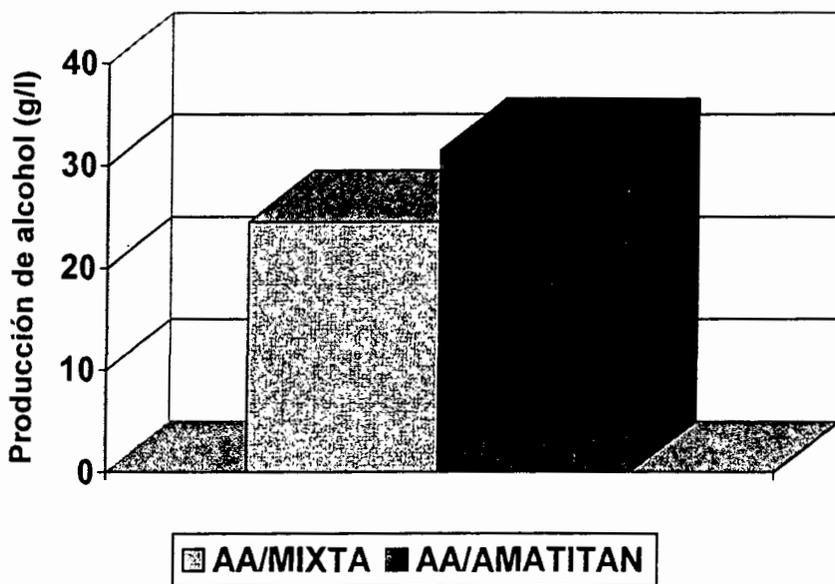


Figura 14. Producción de alcohol de las dos mezclas de levaduras en jugo de agave a las 42 h de fermentación.

### 6.5.4 Rendimiento de alcohol en jugo de agave

El rendimiento de alcohol para las dos mezclas de levaduras en jugo de agave se presenta en la figura 15. Este fue de 0.47 g/g para AA/AMATITAN y de 0.44 g/g para AA/MIXTA. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de lo reportado en mezclas de levadura-bacteria (*Saccharomyces* y *Zymomonas*), y de levadura-levadura, en donde han obtenido rendimientos de 0.5 g/g en sacarosa y jugo de agave como sustrato, respectivamente (Abate *et al.*, 1996; Bernal-Abascal *et al.*, 1999).

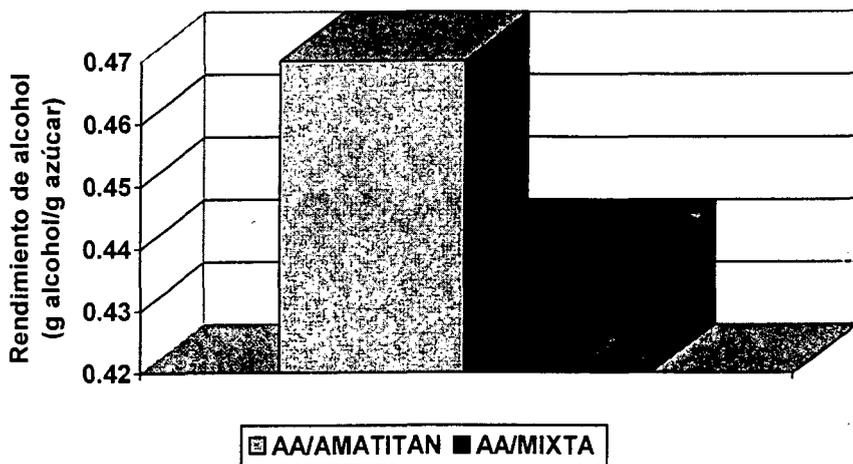


Figura 15. Rendimiento de alcohol de las dos mezclas de levaduras en jugo de agave.

### 6.5.5 Productividad de alcohol en jugo de agave

La productividad de alcohol en jugo de agave de las dos mezclas de levaduras se observa en la figura 16 y fueron de 0.773 y 0.629 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para AA/AMATITAN y AA/MIXTA. Esta productividad es baja en comparación con el 1.5 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> obtenido en otro substrato como es la sacarosa y una mezcla de *Saccharomyces* y *Zymomonas*. (Abate *et al.*, 1996).

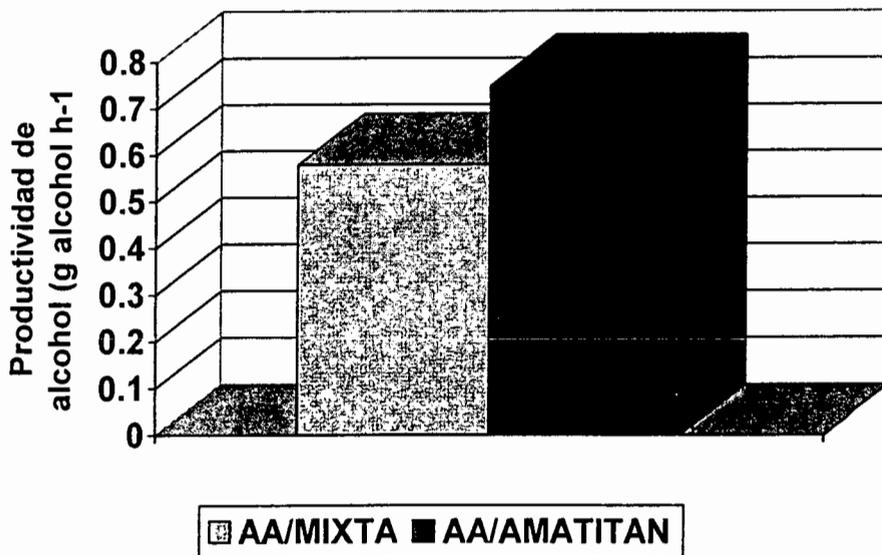


Figura 16. Productividad de alcohol en jugo de agave de las dos mezclas de levaduras.



### 6.5.6 Eficiencia en jugo de agave

En la figura 17 se presenta la eficiencia de las dos mezclas de levaduras en jugo de agave, esta fue del 88% para AA/MIXTA y del 73% para la AA/AMATITAN. Al comparar los resultados con lo reportado en la bibliografía se consideran bajos ya que se ha logrado una eficiencia de hasta 94%, en agave pero con otras cepas de levaduras. Además, la fermentación del jugo de agave se realizo en otras condiciones, tales como una temperatura de 35°C y un tiempo de 72 h (Bernal-Abascal *et al.*, 1999).

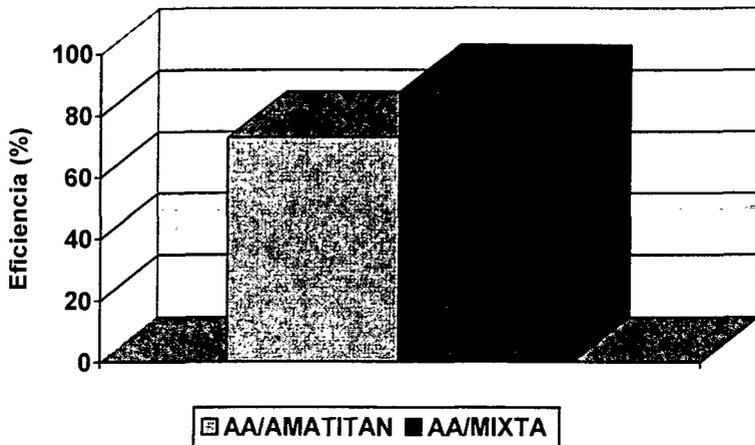


Figura 17. Eficiencia de las dos mezclas de levaduras en jugo de agave.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron y evaluaron cepas de levaduras que fermentan mostos tequileros, para ello se determinaron varios parámetros de crecimiento y de fermentación de las 5 cepas de levaduras obtenidas. Posteriormente se seleccionaron tres de las mejores cepas para evaluar los parámetros de fermentación de dos mezclas de cepas. Lo anterior se realizó con la finalidad de obtener mostos fermentados con mezclas de cepas de levaduras que permitan optimizar la producción de tequilas, y de acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Todas las cepas evaluadas llevaron a cabo una fermentación alcohólica en mostos tequileros.
- La cepa AA presentó la mayor producción de alcohol así como el mayor rendimiento de biomasa y de alcohol.
- La cepa AMATITAN fue la que obtuvo menor producción de alcohol y rendimiento de alcohol.
- Las cepas seleccionadas para evaluar los parámetros de fermentación en las mezclas fueron la AMATITAN por el menor tiempo de duplicación, la MIXTA ya que presentó el mayor rendimiento de biomasa y la AA que mostró los mejores parámetros de fermentación.
- Las mezclas de las cepas presentaron gran diferencia en la producción de alcohol, siendo la mezcla AA/AMATITAN la que obtuvo la mayor producción con 31.5 g/l y la menor fue para la mezcla AA/MIXTA con 24.5 g/l lo mismo paso en el rendimiento de la biomasa y en la productividad.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abate C., E. Rodríguez y O. Garro, 1996. Etanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Appl. Microbiology and Biotechnology, 45(5):580-583.
- Arellano M., M. Alba, L. Pinal, I. Rodríguez-Buenfil, P. Téllez y A. Gschaedler, 1999a. Caracterización de levaduras nativas aisladas del jugo del agave cocido utilizado en el proceso de elaboración del tequila. Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca, México. p. 251.
- Arellano M., C. Pelayo e I. Rodríguez-Buenfil, 1999b. Producción de compuestos organolépticos por una levadura silvestre, durante la fermentación de mosto tequilero a temperatura ambiente y controlada. Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca, México. p. 250.
- Atiyeh H. y Z. Duvnjak, 2001. Study of the production of fructose and ethanol from sucrose media by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57(3):407-411.
- Bernal-Abascal S., M. Arellano-Plaza, C. Pelayo e I. Rodríguez-Buenfil, 1999. Comparación de la producción de compuestos organolépticos por levaduras silvestres y mezclas de ellas en la fermentación de mosto tequilero. Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Huatulco, Oaxaca, México. p. 249.
- Blanco G. y M. Harryman, 1987. Evaluación económica de la producción de alcohol con diferentes tecnologías. ICIDCA, XXXI, 52-65.
- Bohringer P. y L. Jacob, 1964. The determination of alcohol using chromic acid. Zeitschr. Flussiges, 31, 233.
- Camara Nacional de la Industria Tequilera, informe parcial (enero a octubre) 2002.
- Cedeño C. M., 1995. Tequila production. Critical reviews in biotechnology, 15(1):1-11.
- Concheiro A. A., 1985. Biotecnología y Energía. Perspectivas de la biotecnología en México. Ramírez (Editor). CONACYT, México. pp. 445-461.
- Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: (3).
- Gough S., y A. P. McHale, 1998. Continuous ethanol production from molasses at 45 °C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in a continuous-flow bioreactor. Bioprocess Engineering, 22(1):33-36.
- Jones R. P., N. Pamment y P. F. Greenfield, 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environmental and other variables. Process Biochemistry 16(3):42.
- Kar R. y L. Viswanathan, 1985. Etanolic fermentation by thermotolerant yeast. J. Chem. Tech. Biotechnol. 35-B.4:235-238.
- Kiransree N., M. Sridhar, L. Venkateswar, 2000. Characterisation of thermotolerant, ethanol tolerant fermentative *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioprocess Engineering 22(1):243-246
- Kirk R. E y D. F. Othmer, 1981. Alcohol industrial. Producción de alcohol, Enciclopedia de la tecnología química: UTEHA 1:745-781.

- Kondo A., H. Shigechi, M. Abe, K. Uyama, T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, M. Kishimoto y H. Fukuda, 2002. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(1):291-296.
- Koutinas A., C. Gourdoupis, C. Psarianos, A. Kaliafas y M. Kanellaki, 1991. Continuous potable alcohol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on mineral kissiris. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30(2):203-216.
- Leaute R., 1990. Destillation in alambic. *American Journal of Enology and Viticulture* 41(1):90-103.
- Maiorella B. L., H. W. Blanchy y C. R. Wilke, 1983. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering* 26(1):1003-1025.
- Margaritis A. y C. R. Wilke, 1978. The rotorfermentor. II. Application to ethanol fermentation. *Biotechnology Bioengineering* 20(5):727-753.
- Murillo M. E., M. Gallegos y W. Galan, 1984. Producción de etanol por diversas cepas de *Zymomonas mobilis* aisladas de diferentes fuentes naturales, Congreso Nacional de Microbiología, MI-2:142.
- Nigam J. N., B. K. Gogoi y R. L. Bezbaruah, 1998. Agar immobilized yeast cells in tubular reactor for ethanol production. *Indian J. Exp. Biol.* 36(8):816-819.
- Ohta K., S. Hamada y T. Nakamura, 1993. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3):729-733.
- Phaff H. J., M. W. Miller y E. M. Mark, 1978. *The life of yeast* second. Ed. Harvard University Press, Londres.
- Pinal L., I. Rodríguez-Buenfil y A. Gschaedler, 1999. Proceso de elaboración del tequila: Influencia del tiempo de cocimiento del agave sobre el desarrollo de la fermentación. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería.* Huatulco, Oaxaca, México. p. 252.
- Pinal L., 1990. Comparación de la producción de alcohol de cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. U. de G. Guadalajara, Jalisco. México.
- Pinal L., 1997. Evaluación de los factores que influyen en la formación de alcoholes superiores durante la fermentación alcohólica, en la producción de tequila. Tesis de Maestría en Procesos Biotecnológicos. U. de G. Guadalajara, Jalisco. México.
- Prescot K. S., C. D. Gordon, 1962. Producción Industrial de alcohol por fermentación. *Microbiología Industrial*, Editorial Aguilar. 3ª Edición, Madrid., pp.110-133.
- Ramírez E. y P. Téllez, 1999. Evaluación del incremento en el rendimiento, debido a la cantidad de inóculo en un mosto 100% agave. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería.* Huatulco, Oaxaca, México. p. 254.
- Rodríguez D., 1990. Evaluación de la tolerancia al etanol de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. U. de G. Guadalajara, Jalisco. México.

- Rose A. y J. S. Harrison, 1980. The yeast, physiology and biochemistry of yeast, Academic Press Londres pp. 122-124.
- Roukas T, 1994a. Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:296-301.
- Roukas T, 1994b. Kinetics of ethanol production from carob pods extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Appl. Biochem. Biotechnol. 44:49-64.
- Secofi, 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas, Tequila, Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 31 de Mayo.
- Sherman, F. [http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman\\_f/yeast/index.html](http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/index.html). Modificado de: Sherman F., 1997. Yeast genetics. The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Meyers (Ed.) pp. 302-325 Weinheim.
- Stewart R., 1985. The biology of *Saccharomyces*, Biotechnology series. Biology of industrial microorganisms Biotechnology. pp. 511-536.
- Sturion C. A, 1988. Tecnología de producción de alcohol por fermentación. GEPLACEA. pp. 25-38.
- Turker N., Y. Coskuner, H. Ekiz, S. Aksay y E. Karababa, 2001. The effects of fermentation on the thermostability of the yellow-orange pigments extracted from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). European Food Res. Technol. 212:213-216.
- Varnam H. A. y P. J. Sutherland, 1994. Bebidas. Tecnología, Química y Microbiología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

## 9. ANEXOS

**Tiempo de duplicación:**

$$td = \frac{L(2)}{\mu \cdot \max}$$

**Rendimiento de biomasa**

$$Y_{x/s} = \frac{\text{biomasa (g)}}{\text{azúcar en sustrato (g)}}$$

**Rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ):**

$$Y_{p/s} = \frac{\text{ETANOL} \cdot \text{PRODUCIDO. (g / l)}}{\text{CONSUMO} \cdot \text{DE} \cdot \text{SUSTRATO. (g / l)}}$$

**Eficiencia de fermentación:**

$$E = Y \frac{P/s}{0.52 *}$$

\*Rendimiento máximo teórico