
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE DOS LEVADURAS
DURANTE LA FERMENTACIÓN EN JUGO DE *Agave tequilana* Weber Var. *azul*,
EN CINCO DIFERENTES EDADES.

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

FLOR ISELA GARCÍA NIÑO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio del 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. FLOR ISELA GARCÍA NIÑO
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título "**Comparación de los parámetros cinéticos de dos levaduras durante la fermentación en jugo de *Agave tequilana* Weber var. *azul*, en cinco diferentes edades**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **M.C. LETICIA PINAL ZUAZO** y como Asesor el **M.C. JOSÉ ARMANDO ARIAS GARCÍA**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. 09 de mayo del 2003



DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
COORDINADORA DE LA CARRERA DE LICENCIATURA EN
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Leticia Hernández López
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. **M.C. LETICIA PINAL ZUAZO**.-Director del Trabajo
c.c.p. **M.C. JOSÉ ARMANDO ARIAS GARCÍA**.- Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación, en la modalidad de tesis. Que realizo la pasante: **Flor Isela García Niño** código **093646584** con el título: **Comparación de los parámetros cinéticos de dos levaduras durante la fermentación en jugo de *Agave tequilana* Weber var. azul, en cinco diferentes edades**, 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 sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Las Agujas, Zapopan, Jal. a 25 de Junio del 2003

EL DIRECTOR DEL TRABAJO


M.C Leticia Pinal Zuazo



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

SINODALES

EL ASESOR


M.C José Armando Arias García

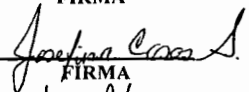
1.- Biol. Sergio Fausto Guerra
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

2.- M.C Luis Villaseñor Ibarra
NOMBRE COMPLETO

FIRMA

3.- M.C Josefina Casas Solís
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

4.- M.C José Armando Arias García
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

DEDICATORIA

A DIOS: A dios que me dio la oportunidad y la vida de llegar a esta meta de mi vida y por todas las cosas buenas que me has dado.

A MI HIJO: Que me ha dado la suficiente fuerza para seguir adelante te quiero mucho Angel.

A MI MAMA Y A MI PAPA: Que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas y por su gran apoyo físico, moral y económico que han hecho para que yo llegara hasta este punto de mi vida los quiero mucho, son una parte importante en mi vida aunque no se los diga LOS AMO gracias por ser como son.

A MIS HERMANOS: Que siempre me han tolerado en mis malos momentos y por su apoyo moral y físico que siempre me han brindado si pudiera escoger hermanos los elegiría a ustedes gracias por ser tan buenos los quiero mucho.

A CITO: Por su paciencia y tolerancia a que yo llegara a esta meta gracias por lo que me has dado te quiero y te amo mucho.

A MI ABUELITA CONCHITA: Que de donde estés me estas dando muchos ánimos para seguir adelante como siempre me los diste y se que hubieras estado orgullosa de verme en este momento. Abuelita siempre te recuerdo como un ejemplo a seguir TE AMO. ✦

MIS MAS SINCERO AGRADECIMIENTO:

A la Universidad de Guadalajara por haberme permitido concluir mis estudios en dicha institución.

Al Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ) por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en dicha institución.

A mis Maestros: Mi más profundo respeto y reconocimiento a todos aquellos que de manera directa o indirecta participaron en el cumplimiento de esta meta.

A Luz Maria Pinal Zuazo: Por todo su apoyo, tiempo y dedicación que me brindo desde el inicio de dicho proyecto GRACIAS.

A mi Directora de tesis: Leticia Pinal Zuazo por su paciencia, y todos los conocimientos compartidos.

A mi Asesor: José Armando Arías García por compartir su tiempo y dedicación en la realización de este trabajo.

A mis Sinodales: Josefina Casas Solis, Sergio Fausto Guerra y Luis Villaseñor Ibarra, por haber compartido su tiempo en dicho proyecto.

A la Señora Lourdes y al Señor Efrén: por ser tan buenas gentes.

A mis Amigos: Lusmila, Rodolfo, Ramon, Gustavo, Gilberto, José, Ulises, Juan, Juan Carlos, Gige, Guera, Ana, por su apoyo desinteresado y consejo durante esas horas de trabajo.

COMPROMISO CONMIGO MISMO

Yo....

- 1.- Puedo ser el mejor en mi actividad, porque fui creado con todos los atributos necesarios para ser GRANDE.
- 2.- Lucharé por mantener un propósito digno y una actitud mental positiva en todo momento, porque sé que es la única manera de lograr la FELICIDAD.
- 3.- Viviré intensamente el día de HOY, que es el más importante y me olvidaré de la amargura del ayer y la incertidumbre del mañana.
- 4.- Adoptaré en mi pensamiento para siempre la palabra YO PUEDO e intentaré lo imposible, que es el privilegio de los dioses.
- 5.- Estaré dispuesto a pagar el precio para ver mis más anhelados sueños convertidos en realidad.
- 6.- En resumen, hoy me comprometo con todas las fuerzas de mi ser a pregonar esta filosofía conmigo mismo, con mi familia, con mis amigos y con toda la comunidad.

Es un reto a mi grandeza y sé que triunfaré.

YO PUEDO SER EL MEJOR

H. TASSINARI

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 BEBIDAS ALCOHOLICAS.....	3
2.2 TEQUILA	4
2.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TEQUILA.....	7
2.4 TIPOS DE TEQUILA.....	14
2.5 HISTORIA DE LAS LEVADURAS.....	15
2.6 TIPOS DE LEVADURAS.....	16
2.7 CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS.....	17
2.8 LEVADURAS PERJUDICIALES PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL TEQUILA	22
2.9 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LEVADURAS CONTAMINANTES.....	23
2.10 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE COMPARACIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS EN JUGO DE <i>Agave tequilana</i> Weber var, azul.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
4. MATERIALES Y METODOS.....	26
4.1 EQUIPO UTILIZADO.....	26
4.2 MICROORGANISMOS.....	27
4.3 AGAVE.....	27
4.4 COCIMIENTO DE AGAVE.....	27

4.5 MEDIOS DE CULTIVO.....	28
4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE CRECIMIENTO.....	29
4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE FERMENTACIÓN.....	29
4.8 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN EL JUGO DE AGAVE DE LAS CINCO EDADES.....	30
4.9 FERMENTACIONES EN EL JUGO DE AGAVE DE LAS CINCO EDADES..	31
4.10 TÉCNICAS.....	31
4.11 POBLACIÓN CELULAR.....	35
4.12 CÁLCULOS.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	39
5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.....	39
5.2 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.....	47
5.3 ANÁLISIS POR HPLC.....	56
6. CONCLUSIONES.....	58
7. LITERATURA CITADA.....	60

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Velocidad especifica de crecimiento (μ) para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave.....	43
Cuadro 2 Análisis de varianza para la variable μ	44
Cuadro 3. Velocidad de consumo de sustrato (r_s) para la levadura de panificación y de vinificación en las cinco diferentes edades de maduración del agave.....	45
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable consumo de sustrato (r_s)....	45
Cuadro 5. Tiempo de duplicación (T_d) para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave.....	46
Cuadro 6. Análisis de varianza para el tiempo de Duplicación (T_d).....	47
Cuadro 7 Rendimiento de la levadura de panificación y de vinificación en 5 edades de maduración del agave.....	51
Cuadro. 8 Análisis de varianza para rendimiento.....	51
Cuadro 9. Eficiencia para la levadura de panificación y vinificación en cinco diferentes edades de maduración del agave.....	53
Cuadro 10. Análisis de varianza para la eficiencia.....	53
Cuadro 11. Producción de Etanol en las cepas de Panificación y vinificación en cinco diferentes edades de maduración del agave.....	55
Cuadro 12. Análisis de varianza para la producción de Etanol.....	55

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Cinética de crecimiento de la levadura L-O22 (Panificación) en cinco diferentes edades de maduración.....	39
Fig. 2 Cinética de crecimiento de la levadura 46-edv (Vinificación) en cinco diferentes edades de maduración.....	40
Fig. 3 Cinética de consumo de azúcares para la levadura de panificación.....	41
Fig. 4 Cinética de consumo de azúcares para la levadura de panificación.....	42
Fig. 5 Cinética de fermentación levadura de vinificación.....	48
Fig. 6 Cinética de producción de etanol y consumo de azúcares con la levadura de panificación.....	49
Fig. 7 Contenido de azúcares en el jugo de agave crudo de diferentes edades de maduración.....	56
Fig. 8 Contenido de azúcares en el jugo de agave cocido de diferentes edades de maduración.....	57

RESUMEN

Debido a la gran demanda que en los últimos años ha tenido el consumo de tequila, la industria atraviesa por una serie de problemas los cuales han ocasionado serias repercusiones en la producción. Debido a la falta de planeación en cuanto a la siembra del agave, el incremento en la producción de tequila, entre otros factores, el sector tequilero se vio en la necesidad de emplear agaves con menor tiempo de maduración del que normalmente se utilizaba (8 y 10 años). Por tal motivo fue importante conocer el comportamiento de diferentes cepas, una utilizada para la producción de vino y otra para la elaboración del pan en la fermentación de jugo de agave con diferentes tiempos de maduración.

En el presente trabajo se compararon los parámetros cinéticos de crecimiento y fermentación de una cepa de levadura de panificación y una de vinificación en jugo de agave de 5 edades de maduración (4, 5, 6, 7 y 8 años).

No se encontraron diferencias estadísticas entre las cepas de levaduras, es decir las cepas presentaron un nivel de significancia menor a 0.5 en cuanto a los parámetros de crecimiento y de fermentación; en las diferentes edades de maduración del agave no se encontraron diferencias estadísticas, ya que presentaron un nivel de significancia menor a 0.5.

Al evaluar las edades de maduración del jugo de agave no se identificaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de crecimiento.

En cambio para los parámetros cinéticos de fermentación se encontraron diferencias significativas entre las cinco diferentes edades de maduración del agave, en donde la mayor producción de etanol se obtuvo en el jugo de ocho años con 29.26 ± 0.516 y 30.21 ± 0.438 g/l.

En los análisis de azúcar realizado por HPLC, inulina, sacarosa, dextrosa y fructosa. El jugo de agave cocido contiene inulina en proporciones muy bajas al contrario del jugo de agave crudo en donde la inulina esta en mayor proporción de los demás elementos encontrados.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales bebidas que se producen en México es el tequila y, tiene gran aceptación en el mercado nacional como internacional por sus características organolépticas. El *Agave tequilana* Weber Var. *azul* es cultivado en la región de denominación de origen, en la actualidad a la industria tequilera así como los problemas que se han generado, por ello en los últimos años se ha tenido la necesidad de aplicar nuevos métodos y procesos con el fin de incrementar la producción y alcanzar mayores eficiencias, y que a su vez obtener un tequila de mayor calidad.

La elaboración de bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer el origen de esta práctica. Durante mucho tiempo el hombre supo fermentar los mostos, sin tener idea del papel ni de la existencia de los microorganismos.

Hoy en día se conocen a las levaduras y son utilizadas en la industria tequilera durante la fermentación ya del mosto; la especie más utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae* o bien se puede utilizar otras especies pero esta es una de las más favorables en la producción del tequila.

Es recomendable que la industria tequilera utilice cepas de levaduras eficientes ya que con levaduras de baja calidad se pierde hasta un 35% de la producción total del tequila. Las características requeridas para las cepas en la industria tequilera son:

- ⊕ Rendimientos altos y eficaces de fermentación.
- ⊕ Resistencia alta o moderadas al etanol
- ⊕ Resistencia a temperaturas altas
- ⊕ Equilibrio en la producción de compuestos organolépticos.

En el presente trabajo se evaluaron cepas de dos tipos de levaduras: una de vino y otra de panificación en jugo de agave de diferentes edades con el fin de determinar cual es más eficiente en la producción del tequila. Además se estudio el efecto de las edad del agave sobre el rendimiento de fermentación.

2. ANTECEDENTES

2.1 BEBIDAS ALCOHOLICAS

La producción de bebidas alcohólicas es una actividad ligada a la mayoría de las culturas durante milenios. Con la gran importancia que tienen estos productos, la investigación científica y tecnológica relacionada con las fermentaciones alcohólicas se han concentrado desde hace muchos años a grandes esfuerzos para mejorar la calidad de las bebidas.

Dentro de las industrias biotecnológicas, la industria tequilera es la de mayor importancia económica en todo el mundo y con los avances se ha extrapolado a muchas aplicaciones en la biotecnología y la tecnología de los alimentos a lo largo de más de un siglo y medio (García *et al.*, 1993).

La elaboración de bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer con precisión el origen de esta práctica. Durante milenios el hombre supo fermentar mostos que contenían carbohidratos, incluso aprendió a destilar alcohol para aumentar su concentración en las bebidas, todo sin tener idea del papel ni de la existencia de los microorganismos. Probablemente, las primeras bebidas se hicieron a partir de sustratos azucarados como los jugos de fruta, ya que estos solamente requieren del contacto al jugo con la levadura silvestre presente en la superficie de la propia fruta. Desde esas épocas, las

diferentes civilizaciones han aprendido a fermentar diversos sustratos a fin de producir sus bebidas alcohólicas autóctonas.

En general estas bebidas contenían el grado alcohólico logrado exclusivamente por la fermentación, y fue hasta el siglo XV cuando se empezó a popularizar el arte de la destilación, dando lugar a las bebidas con mayor contenido alcohólico (García *et al.*, 1993).

Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diversas materias primas, pero en particular de cereales, frutas y otros productos azucarados. En general presentan contenido significativo de etanol; el sabor y aroma de las bebidas alcohólicas esta influenciado en gran parte por este compuesto, el cual es obtenido mediante la fermentación de los azúcares.

Además durante esta etapa se producen una gran variedad de componentes volátiles, que dan lugar a productos con diferentes características organolépticas (Gómez *et al.*, 1993). Estos compuestos se pueden clasificar en: alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos, esteres y compuestos azufrados, en conjunto reciben el nombre de congenéricos (García *et al.*, 1993).

2.2 TEQUILA

De las principales bebidas que se producen en México y que son destiladas el tequila es la que tiene características organolépticas muy

especificas como es el sabor y por ello tiene mayor preferencia en el mercado nacional como internacional.

La elaboración de esta bebida es por medio del jugo fermentado del *Agave tequilana* Weber var. azul que es cultivado en la zona de denominación de origen (García *et al.*, 1993; Cedeño, 1993).

El tequila es una bebida con arraigo y tradición, pocas empresas cuentan con proceso de producción totalmente estandarizado. En la actualidad no hay muchos estudios en la elaboración de esta bebida, sin embargo, ha crecido la industria tequilera, así como también los problemas que se han generado en los últimos años. Por lo anterior es necesario optimizar los métodos y los procesos con el fin de incrementar la producción y alcanzar mayores eficiencias, y que a su vez permitan obtener un tequila de mayor calidad (Cedeño, 1995).

Para controlar la calidad del producto es necesario establecer condiciones optimas, en cada una de las etapas del proceso, y conocer las principales variables que influyen tanto en el rendimiento como en las características organolépticas de la bebida (Santos *et al.*, 1991; Latorre *et al.*, 1994).

El tequila tiene denominación de origen ya que es un producto distintivo de México y esta controlado por una norma oficial. La declaración general de protección a la denominación de origen del Tequila publicada en el diario oficial de la federación el día 13 de octubre de 1977

en donde el estado Mexicano se constituyo como único titular de dicha denominación, en virtud de corresponder a un producto distintivo de México.

La ley federal sobre metrología y normalización el 3 de septiembre de 1997, publico en el diario oficial de la federación la Norma Oficial Mexicana NOM-006 SCFI-1994 de bebidas alcohólicas, tequila; en la cual se establecen las características que debe cumplir esa bebida alcohólica, en cuanto a especificaciones físico-químicas, materia prima, envasado, comercialización, marcado, etiquetado y denominación de origen. (NOM 006-SCFI-1994).

Las bebidas alcohólicas tienen estrictos estándares de control de calidad que tradicionalmente son verificados mediante análisis fisicoquímicos específicos (Mulet *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1993) o sensoriales que proporcionen resultados satisfactorios de su región de origen geográfico y proceso de producción.

Las bebidas que cuentan con la denominación de origen son el Coñac, la Champaña el Borurbon, el Jerez y el Tequila.

2.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TEQUILA

2.3.1 Tiempo de maduración de agave

El agave para su maduración necesita entre ocho y diez años, aquí es cuando comienza el proceso de floración, lo que se hace evidente por la emisión de una inflorescencia vertical o quiote. Esto es señal de que la planta se acerca al final de su vida, por lo que es importante cosechar antes de la inflorescencia ya que esto implica una rápida degradación de la inulina y finalmente la pudrición de la planta. La norma del consejo regulador del tequila (CRT), indica que el 100% de los azúcares deben provenir del *Agave tequilana* Weber var. *azul* con el fin de ser considerado un tequila cien por ciento agave (Cedeño, 1995).

2.3.2 Cultivo del agave

Existen varias especies de agave, cuyo jugo puede ser fermentado y destilado para la producción de bebidas alcohólicas, sin embargo, sólo el *Agave tequilana* Weber var. *azul* es el único autorizado para la elaboración de tequila. El cultivo de esta planta requiere de la combinación de numerosos factores como:

- La altitud, preferentemente a 1500 metros sobre el nivel del mar.
- Las condiciones de la tierra, favorablemente suelo volcánico, arcilloso, permeable y abundante en elementos derivados del basalto y riqueza en fierro.

- Pluviosidad, cerca de un metro anual.
- Temperatura constante de clima semiseco que oscile entre los 20°C. Importante la exposición al sol, ya que se considera favorable que exista nublados entre 65 y 100 días del año.

Sólo una región de aproximadamente 209 km² en el estado de Jalisco reúne las mejores condiciones, para la mejor reproducción del *Agave tequilana* Weber var. Azul : la famosa región de Tequila. (Alvarez, 1996).

2.3.3 Calidad del agave

Para obtener alto nivel de calidad, durante el proceso siempre debe haber una selección minuciosa de las plantas madres así como de los hijuelos. Durante el crecimiento de la planta se van realizando algunas labores que ayudan a la misma a producir y conservar el máximo nivel de almidones en el corazón.

A los seis años, para favorecer su madurez, se realiza barbeo de escobeta rebajado, que consiste en hacer cortes horizontales en la parte superior de las hojas dejando la superficie plana. Casi al llegar a la madurez, el barbeo se va haciendo estricto, hasta dejar la piña casi sin pencas, este barbeo es denominado barbeo castigado.

Una vez alcanzada la madurez y en los meses secos, el agave comienza a reducir el tamaño de sus hojas en el centro, haciéndose más pequeñas y numerosas por el crecimiento de una inflorescencia llamada quiote. Este quiote crece rápidamente y consume todos los azúcares que

se acumularon durante años, por lo que es cortado; a esta operación se le llama desquiote.

Después de que el agave ha llegado a su plena madurez, se lleva a cabo la cosecha y durante esta se realiza la jima, ya que en la elaboración del tequila se utiliza únicamente la parte central (corazón, piña o cabeza) de la planta, donde se concentra la mayor cantidad de azúcares.

En la jima se utiliza la herramienta llamada coa, que consiste en una barreta con la punta semicircular sumamente filosa, para cortar y eliminar las hojas del agave quedando sólo la médula, misma que es separada de la tierra eliminando la raíz hasta dejar la piña. Dependiendo de la edad, del tipo de agave y de la forma del corte, la piña llega a pesar cien o más kilos. La persona que realiza este proceso es llamado jimador.

En las compañías destiladoras que se precian de mantener altos y estrictos estándares en el proceso, apegados a conseguir productos premium, prácticamente es en la jima donde se inicia la elaboración del tequila, ya que desde la cosecha son seleccionados los agaves en su punto óptimo de madurez.

Desde la llegada a la fábrica empieza el control de calidad, ya que al recibo de la materia prima, es seleccionada al azar una muestra de piñas de cada lote y son analizadas en el laboratorio para determinar si los niveles de azúcares y madurez son adecuados y establecer los tiempos de cocción (Cedeño, 1993, 1995).

2.3.4 Cocción

Antes de introducir en los hornos, las piñas son partidas en dos o cuatro partes según su tamaño, para favorecer un perfecto cocimiento y óptimo aprovechamiento, dentro de los hornos, se van acomodando manualmente las piñas. Una vez completada esta operación en el horno, se inicia el proceso de cocción y se prolonga por espacio de 48 horas en promedio, inyectando vapor de agua en el horno.

El propósito de esta cocción es el de conseguir la solubilidad e hidrolizar los azúcares del agave, ya que la inulina es poco soluble en agua y no fermentable en forma directa en el proceso tradicional se emplean hornos de mampostería aunque en la actualidad algunos productores de tequila realizan el cocimiento de agave en autoclaves. Las piñas del agave después de su cocimiento permitirán desdoblar sus azúcares y de esta manera los jugos o mostos quedarán listos para su fermentación (Cedeño, 1993, 1995).

2.3.5 Molienda

Después del perfecto cocimiento, se descargan los hornos y las piñas cocidas se trasladan al área de molienda. La molienda se divide en varias etapas y tiene como propósito extraer los azúcares que se encuentran en la fibra del agave. Esto se lleva a cabo en molinos cuya estructura va desde la piedra hasta trituradoras y molinos de acero inoxidable, según el fabricante.

La etapa de molienda se inicia con el desgarramiento en las piñas, el cual consiste en pasar el agave cocido por una máquina que se encarga de desmenuzarlo para, posteriormente, llevarlo a una sección en donde prensas de tipo cañero exprimirá los jugos.

Una vez exprimido este material fibroso, pasa por una sección donde se aplica agua para la máxima extracción de los azúcares. Como resultado de este proceso se obtiene un jugo de agave que contiene 12% de azúcares. Con esta materia prima se formula el mosto o caldo para la fermentación (Cedeño, 1993, 1995).

2.3.6 Fermentación

Preparado el mosto para fermentación éste se inocula con un cultivo, ya que la levadura utilizada juega un papel muy importante en la fermentación e involucra la conversión de los azúcares fermentables del agave y otros azúcares adicionados a alcohol etílico, dióxido de carbono y otros compuestos orgánicos que contribuyen a las características organolépticas del producto final, el cual puede ser una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* o bien alguna otra especie.

La fermentación se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable de volumen variable, abiertos y controlando la temperatura que oscila entre los 30 y los 42 °C.

Este proceso fermentativo puede durar entre 12 y 72 horas, dependiendo del grado de alcohol deseado que puede ser de 6% para tequila mixto y 4.5% para tequila 100%. Terminada la etapa de

fermentación, se deja en reposo el mosto para propiciar la generación de compuestos aromáticos importantes en el producto (Cedeño, 1993, 1995).

2.3.7 Destilación

Existen dos formas de realizar la destilación: mediante la utilización de alambiques o en columnas, siendo el primero el más usual. En el primer caso, regularmente se utiliza un tándem de dos alambiques de cobre, material que ayuda a eliminar compuestos sulfurados indeseables.

En el primer alambique, el mosto muerto se calienta con vapor y se destila hasta tener un producto intermedio ordinario, con una concentración de alcohol de entre el 25 y el 30%, al cual se le han removido los sólidos, parte del agua y las cabezas y colas. Las primeras contienen componentes volátiles que destilan antes que el etanol, debajo de los 80°C, como metanol, isopropanol y acetato de etilo, y las segundas contienen alcoholes menos volátiles como amílico y algunos ésteres.

En el segundo alambique, el ordinario se destila nuevamente para enriquecer el contenido alcohólico hasta el 55%, además de refinar considerablemente el producto. Este tequila al 55% se considera un producto final, ya que de hecho es el que se comercializa a granel. Antes de envasarse, este destilado se diluye con agua desionizada, para lograr productos finales de 38 a 43%.

Al utilizar columnas se emplean hasta tres en tándem. En este caso el mosto entra a la columna por la parte superior, a contracorriente con vapor, con lo que se evaporan los compuestos volátiles que se condensan en los diferentes platos de la columna; normalmente cuando se emplean columnas en vez de alambiques el producto es más neutro, debido a que la destilación es más selectiva (Cedeño, 1993, 1995).

2.3.8 Maduración

Una vez destilado, el producto final se concentra en tinas de paso en donde se diluye para pasarlo a los pipones o barricas donde se añejará dependiendo del tequila que se desee obtener. En la maduración de tequilas, la última etapa se realiza en barricas o pipones de roble o encino blanco, maderas que confieren al producto final aromas, colores y sabores muy peculiares, los cuales dependen de diversos factores como la edad, grosor de la duela, graduación alcohólica y condiciones de reposo o añejamiento. Son muy importantes las condiciones de humedad y ventilación, ya que el proceso de envejecimiento se llevan a cabo reacciones oxidativas.

Por último, antes de embotellar es necesario eliminar algunos sólidos conferidos por la madera, esto se realiza a través de filtración con celulosa o carbón activado (Cedeño, 1993, 1995).

2.4 TIPOS DE TEQUILA

2.4.1 Tequila blanco

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

2.4.2 Tequila joven u oro

Producto susceptible de ser abocado, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de tequila blanco con tequilas reposados y/o añejos se consideran como tequila joven u oro.

2.4.3 Tequila reposado

Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes tequilas reposados, la edad para el tequila resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

2.4.4 Tequila añejo

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, y con una graduación alcohólica comercial que debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

En mezclas de diferentes tequilas añejos, la edad para el tequila resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

2.5 HISTORIA DE LAS LEVADURAS

En la antigüedad se realizaron muchas observaciones para dar con las levaduras el primero en observar estos microorganismos fue el inventor de microscopio en el s. XVII el estudioso holandés Van Leeuwenhoek, hasta finales del siglo XIX tomando como base los estudios de Pasteur, Kunne mantenía que era necesario un catalizador, pero que éste no era la propia levadura en sí, sino sustancias generadas en su interior por su propio metabolismo. Es decir aunaba aspectos químicos y biológicos. A estos compuestos los bautizó como enzimas (del griego 'en' - dentro, en- y 'zyme' -levadura) aunque fue incapaz de sintetizarlos. A comienzos de la década de 1930, los investigadores alemanes Meyerhof (también galardonado con premio Nóbel) y Embden, cuyos estudios sucesivos finalmente explicaron la secuencia o ruta química del proceso fundamental dentro de la fermentación: la glucólisis. Está última viene definida como la serie de reacciones que provocan la conversión de la glucosa en dos moléculas de ácido pirúvico que a su vez se pueden transformar o en lactatos o en etanol y dióxido de carbono. El proceso es anaeróbico no se necesita oxígeno (Serdio 2002).

2.6 TIPOS DE LAS LEVADURAS

2.6.1 Levaduras de panificación

Las levaduras en la industria de la panificación por lo general son de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y la principal característica de esta levadura, es que presenta gran de crecimiento y un buen rendimiento en el medio utilizado así como una alta resistencia a la congelación.

2.6.2 Levaduras de vinificación

Un mosto de uvas contiene un gran número de especies de levaduras de orígenes diversos: uvas, materiales de recogida y materiales de bodega. Esta flora inicial evoluciona desde el principio hasta el final de esta fermentación.

Se ha visto que *Saccharomyces cerevisiae* son muy sensibles al efecto de la glucosa y el rendimiento celular máximo sólo puede alcanzar un procedimiento de fermentación que permita un aporte progresivo y continuo de la fuente de carbono de tal manera que la concentración instantánea de azúcar en el medio sea nula.

2.6.3 Levaduras de cerveceria

El mosto de una fermentación en la industria cervecera lleva consigo gran cantidad de fenómenos complejos ya que intervienen un gran número de metabolismos de la levadura como el azúcar, aminoácidos, péptidos y lípidos y trae como consecuencia la transformación de azúcares en etanol y la producción de compuestos aromáticos como alcoholes superiores, ácidos y ésteres.

2.6.4 Levaduras en quesos

Las levaduras halladas en los quesos pertenecen con más frecuencia a las especies *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces bulgaricus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida versatilis* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

La flora de levaduras varía según las tecnologías queseras, en particular el salazonado selecciona levaduras tolerantes a la sal en la superficie y después en el queso a medida que va penetrando (Leveau *et al.*, 2000).

2.7 CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS

En 1935 Winge realizó importantes descubrimientos sobre la reproducción sexual de las levaduras de ahí se empiezan a hacer las diferentes clasificaciones de los hongos y las levaduras. Hoy en día sabemos que las levaduras son hongos unicelulares y son abundantes en la

naturaleza y presentan distintas formas y pertenecen al reino de los hongos (Fungi) y, dentro de él, están enmarcadas entre los hongos verdaderos o división Eumicote (Pelczar *et al.*, 1997).

2.7.1 Requerimientos nutricionales

El medio de cultivo donde se va a desarrollar las levaduras debe de contener todos los elementos necesarios para cubrir las necesidades energéticas.

El carbono aporta energía ya que es un compuesto mayoritario de la célula de la levadura, entre las fuentes de carbono, los glucidos son los más frecuentemente utilizados ya que se encuentran los glucidos simples como las hexonas.

El Nitrógeno utilizado para la formación de los aminoácidos, los nucleótidos y en algunas vitaminas. Se pueden utilizar numerosas fuentes de nitrógeno ya que las levaduras son capaces de utilizar el nitrógeno en forma de ion amonio y pueden ser adicionados al medio como cloruro amonico, nitrato amonico, fosfato amonico y sulfato amonico ya que al mismo tiempo aporta azufre para la síntesis de ciertos aminoácidos.

El Fósforo se encuentra incluido en los ácidos nucleicos y los nucleosidos di y trifosfato, y en forma de polímeros lineales, juega un papel importante en la regulación del metabolismo celular. Las fuentes de fósforo en el medio debe de estar constituidas por el dihidrogenofosfato

de potasio, si existe una limitante de fósforo en el medio, la célula sintetiza una fosfatasa ácida.

El Azufre es el más frecuentemente utilizado en los medios de cultivo es el sulfato amonico, las levaduras del género *Saccharomyces* son igualmente capaces de utilizar el sulfito y el tiosulfato.

El Potasio es el elemento cualitativamente más importante en la levadura, ya que por cada penetración de un catión metálico divalente hay excreción de 2 K y a un pH ácido el potasio estimula la fermentación e interviene en la estructura del ARN.

El Magnesio es necesario para el funcionamiento de enzimas del metabolismo, como activador de las enzimas glucolíticas, estimulador de las ácidos grasos regulador de la ATPasas de las membranas, participa con el potasio en la penetración del fosfato, una carencia de magnesio en la fermentación hay una producción de ácido acético.

El Calcio no es indispensable para el crecimiento pero juega un papel de estimulador en las *Saccharomyces*. Es utilizado durante la fase de crecimiento y se incorpora en las paredes y en las membranas citoplasmáticas.

El Zinc es necesario en la síntesis de vitaminas como la riboflavina, ya que ayuda la penetración de la maltosa y de la maltotriosa, y estimula la acción del magnesio.

En la actualidad se sabe que existen tres tipos de levaduras en cuanto a los requerimientos de oxígeno ya que no hay levaduras anaeróbicas estrictas se clasifican anaerobias estrictas como las del genero *Rhodotula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* y *Sporobolomyces* otras levaduras son aero-anaerobias las cuales prefieren un metabolismo fermentativo en presencia de oxígeno las del genero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Brettanomyces* y las levaduras que prefieren un metabolismo respiratorio si hay oxígeno como *Pichia* Y *Hansenula* (Leveau *et al.*, 2000).

2.7.1 Cinética de crecimiento de las levaduras

Las levaduras en su cinética de crecimiento presentan cinco fases:

1) Fase de latencia: También conocida como fase de adaptación o retardo, es una consecuencia del choque que sufren las células en encontrarse en nuevo ambiente. No se incrementan inicialmente el número de células, aunque el peso de las células puede cambiar. Durante la fase de latencia el microorganismo se adapta a su nuevo ambiente, ya que de esta transferencia a un nuevo medio, varios parámetros son alterados para las células inoculadas cambios en el valor de pH, incremento en la cantidad de nutrimentos, así como decremento de los inhibidores del crecimiento. Al final de la fase de latencia las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento.

2) Fase exponencial: En esta fase, las células se multiplican rápidamente y la masa celular y el número de densidad celular se incrementa exponencialmente con el tiempo. Este es un periodo de crecimiento balanceado en el cual todos los componentes de la célula crecen con la misma velocidad, esto es, la composición promedio de la célula permanece aproximadamente constante.

3) Fase de crecimiento retardado: En esta fase, el crecimiento desacelera debido a la disminución de uno o más nutrientes esenciales o a la acumulación de productos tóxicos al crecimiento.

4) Fase estacionaria: Tan pronto como el sustrato es metabolizado o sustancias tóxicas para el crecimiento han sido formadas, el crecimiento es completamente detenido, la producción de ciertos metabolitos de gran importancia biotecnológica es realizada durante la fase estacionaria, por ejemplo: antibióticos, hormonas, vitaminas, etc.

5) Fase de declive o muerte: Esta fase se da debido al agotamiento del medio o presencia de un veneno. Además en estas fase la reservas de energía de las células son agotadas. La duración entre la fase estacionaria y la fase de muerte depende del organismo y el proceso usado. En procesos comerciales la fermentación es usualmente interrumpida al final de la fase exponencial o antes que comience la fase de muerte (Cruger, 1984; Bailey, 1986).

Estas fases representan el crecimiento microbiano clásico.

Las fermentaciones alcohólicas presentan varias características ya que la duración de la fermentación es larga, el crecimiento total de las levaduras es limitado y corresponden a cuatro o cinco generaciones antes del cese del crecimiento (Cruger, 1984; Pelczar, 1997).

2.8 LEVADURAS PERJUDICIALES PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL TEQUILA

Así como existen levaduras que son benéficas para la elaboración del tequila también hay levaduras perjudiciales para el proceso, como son las levaduras *Killer*. Esta levadura fue descrita por primera vez por Bevan y Makower en 1963 en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las cuales matan levaduras sensibles secretando al medio una toxina a las cuales ellas son inmunes. Esta toxina trae consigo problemas como pueden dominar en las fermentaciones inoculadas con cepas sensibles, como resultado de estas interacciones existe el peligro de que se produzcan problemas como retrasos en el comienzo del proceso fermentativo, que se detenga la fermentación, incrementar los niveles de ácido acético, ácido láctico, acetaldehído y alcoholes superiores, formación de SO_2 y producción de etanol reducido.

En la actualidad la industria pretende seleccionar cepas de la levadura *Killer* para utilizarlas como cultivos iniciadores ya que podrían prevenir el crecimiento de cepas indígenas que afecten negativamente la calidad del tequila (Torres, 2001).

2.9 TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE LEVADURAS CONTAMINANTES

La empresa tequilera debe de tener bien diferenciadas las especies que se utilizan ya que existen levaduras contaminantes que bajan la producción del tequila. En la actualidad se utilizan dos técnicas para detectar los posibles contaminantes, una es la utilización de medios de cultivos selectivos en la cual la levadura esta seleccionada en medio puro. La otra del método genético y se ha utilizado para diferenciar varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes orígenes. Se extrae el ADN mitocondrial y se cortan con enzimas de restricción, los fragmentos se analizan por electroforesis y se ha demostrado que levaduras de la misma especie pero de clones distintos poseen ADNs mitocondriales diferentes (Leveau *et al.*, 2000).

2.10 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE COMPARACIÓN DE CEPAS DE LEVADURA EN JUGO DE *Agave tequilana* Weber Var. azul.

Alcalá (1994), evaluó la tolerancia al etanol de tres levaduras dos parentales (Scam y L-041) y una termotolerante (KR1) en donde la temperatura optima para la producción de alcohol en las levaduras parentales fue de 35° C y para la termotolerante fue de 45° C . Las tres cepas probadas presentaron un rango de tolerancia etanolica del 0 al 8% con respecto a su rendimiento (Y_p/s) mientras que para la producción de alcohol en (g/l), las cepas parentales solo toleran del 0 al 4% y la cepa termotolerante no presenta tolerancia etanolica.

La mejor cepa fue SCAM ya que mostró mejor rendimiento de fermentación y mejor producción de alcohol seguido por la cepa L-041, la cepa KR1 no presento unidades aceptables de tolerancia al etanol.

Alba en el 2000 encontró eficiencia y rendimiento de 96% y 0.49; sin embargo, se obtuvieron valores menores al 70% en cepas silvestres y la mayor productividad fue de 1.84 g/l/h.

En ese mismo año González, realizo fermentaciones con mezclas de levaduras silvestres aisladas de jugo de agave y observó que hay diferencia significativa entre las mezclas en cuanto a rendimiento (Y_p/s), eficiencia, productividad, R_s y entre las proporciones solo hay diferencia en cuanto a la productividad. Asimismo, con los compuestos organolépticos, la mezcla B1-GU3 produjo mas acetato de etilo, metanol, isobutanol, alcohol isoamílico y 1- butanol; sin embargo, ambas mezclas producen concentraciones similares de 1 pentanol.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento de dos tipos de levaduras durante las fermentaciones de 5 diferentes edades del *Agave tequilana* Weber

var. azul/3.1.2 Objetivos particulares

-Comparar los parámetros cinéticos de crecimiento de dos levaduras en cinco edades de agave (4, 5, 6, 7 y 8 años).

-Evaluar los parámetros de fermentación de dos levaduras en jugo de agave de diferentes edades.

-Cuantificar el contenido de Azúcares Reductores Directos (ARD) de los jugos de las diferentes edades por HPLC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 EQUIPO UTILIZADO

Balanza granataria METTLER PE 1600

Autoclave Infra

Estufa de alta temperatura Felisa

Estufa de incubación Felisa

Orbital rotatorio marca Newbrunswick

Campana de flujo laminar VECO

Microscopio compuesto One Ten American Optical

Cámara de Newbauer marca Propper

Micropipetas Gilson

Centrífuga clínica Solvat Mod. J-12

Potenciómetro Beckman

Microdestilador de vidrio Vicoso

Vortex Fisherbrand

Espectrofotómetro UV/VIS lambda 2 Perkin Elmer

Baño María

Refrigerante Friedrichs

4.2 MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados fueron dos levaduras una de panificación (L-022) y otra de vinificación (L-46EDV) los cuales fueron proporcionadas por el Banco de Cepas del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco). Estas levaduras se conservan liofilizadas.

4.3 AGAVE

Se utilizó *Agave tequilana* Weber Var. azul, el cual fue proporcionado por tres tequileras del municipio de Arandas, Jal.

4.4 COCIMIENTO DEL AGAVE

Para cocer el agave, las cabezas fueron partidas en cuatro partes y se cocieron en autoclave a nivel piloto a una temperatura de 121° C y a 1.5 Kg/cm² de presión, durante 4 h.

La extracción del jugo se realizó con un molino de acero inoxidable, y se guardaron a una temperatura de -20° C, posteriormente se utilizaron para la elaboración de medios de cultivo utilizados en las cinéticas de crecimiento y de fermentación.

4.5 MEDIOS DE CULTIVO

4.5.1 Medios de cultivos para la reactivación.

(YM)

Líquido

Extracto de levadura 3 g/l

Extracto de malta 3 g/l

Peptona 5 g/l

Glucosa 10 g/l

pH 4.5

Al (YM) sólido se le adiciono Agar 21 (g/l)

4.5.2 Medios de cultivo para la propagación

Medio líquido

Jugo de agave 8° BX.

Sulfato de amonio 0.5 g/l

pH 4.5

Medio sólido

Jugo de agave 8° BX.

Sulfato de amonio 5 g/l

Agar 21 g/l

pH 4.5

Los medios de cultivo se esterizaron en autoclave a 121°C y 1.5 Kg/cm² durante 15 minutos. El medio líquido de YM se esterilizo en tubos de ensaye con tapón de baquelita y el medio sólido se esterilizo en matraces Erlenmeyer. El medio líquido de jugo de agave se esterilizo en matraces Erlenmeyer y el medio sólido después de esterilizado se vació en cajas petrí.

4.4.3 Medio de fermentación

Para preparar los medios utilizados en la fermentación se tomó jugo de cada una de las edades, a los cuales se les ajustó el pH a 4.5, con hidróxido de sodio.

Jugo de agave 10° Bx

Sulfato de amonio 0.5 g/l

pH 4.5

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE CRECIMIENTO

Para la etapa de crecimiento se realizó un diseño completamente aleatorizado con un criterio de clasificación de la edad del agave y tipo de levadura con duplicado. Las variables de respuesta sobre las que se estudio el crecimiento de las levaduras fueron: velocidad de crecimiento (?), velocidad de consumo de sustrato (r_s) y tiempo de duplicación (T_d).

4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ETAPA DE FERMENTACIÓN

Para la etapa de fermentación se realizó un diseño completamente aleatorio con un criterio de clasificación de la edad del agave y tipo de levadura con una repetición. Las variables de respuesta sobre los parámetros cinéticos de fermentación de la levadura fueron: rendimiento (Y_p/s), eficiencia y producción de alcohol.

4.7 PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO EN JUGO DE AGAVE DE LAS CINCO EDADES

4.7.1 Propagación del preinoculo

El crecimiento de la levadura en medio sólido se llevó a cabo en cajas petrí con el medio de cultivo de propagación. Para cada edad se sembraron por estrías diez cajas de petri y se incubaron a 30°C durante 48 h. Una vez terminado el tiempo de incubación, la levadura se resuspendió en 10 ml de solución fisiológica (NaCl 0.85%) estéril para cada caja y se determinó la población por conteo directo al microscopio en cámara de Newbauer.

El preinoculo se preparo en un volumen de 300 ml de medio líquido el cual se inoculó con 35 ml de la resuspensión de levaduras completando así, un volumen final de 335 ml.

4.8 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN EL JUGO DE AGAVE DE LAS CINCO EDADES DE AGAVE

Se prepararon por duplicado matraces de 500 ml cada uno con un volumen de 400 ml de medio de propagación con jugo de las diferentes edades y se inocularon con 35 ml de preinóculo ajustando a un volumen final de 435 ml con una población de 20 mill/cel/ml. La incubación se realizó a 30°C a 250 rpm durante 12 hrs.

El monitoreo fue cada dos horas hasta la estabilización de crecimiento de la levadura. Se contó la población de la levadura, se cuantificaron los azúcares consumidos para determinar los parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento (?), velocidad de consumo de sustrato (rs) y tiempo de duplicación.

El desarrollo del preinoculo se realizó de la manera anteriormente descrita, y el inoculo considerando los resultados obtenidos en la etapa anterior se preparó un volumen de 700 ml de medio líquido el cual se inoculó con 55 ml de la levadura desarrollada en el primer paso completando así, un volumen final de 755 ml, los cuales se incubaron en un agitador orbital a 250 rpm y 30° C durante 12 h. Al final del crecimiento se homogenizó todo el inóculo en un solo matraz, al cual se le determinó la población de la levadura, para posteriormente tomar el volumen necesario para iniciar la fermentación.

4.9 FERMENTACIONES EN EL JUGO DE AGAVE DE LAS CINCO EDADES.

Para cada edad de agave se prepararon 2 matraces de 1 litro con un volumen de 700 ml de medio de fermentación y se sembraron con 55 ml de inóculo ajustando a un volumen final de 755 ml, con una población de 20 mill/cel/ml. La incubación se realizó a 35°C en una estufa de temperatura controlada.

El monitoreo fue cada dos horas durante las primeras 6 horas y posteriormente cada 4 horas durante 60 h que duró la fermentación. Se contó la población de la levadura, se determinaron los azúcares consumidos y la producción, para determinar los parámetros de fermentación: rendimiento (Y_p/s), eficiencia (%), alcohol producido.

4.10 TÉCNICAS

4.10.1 Determinación de la concentración de azúcares reductores directos

La cuantificación de los azúcares reductores libres se realizó mediante la técnica de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Reactivos utilizados

Hidróxido de sodio	10 g/l
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	10 g/l
Tartrato de sodio y potasio	200 g/l
Metabisulfito de sodio	0.5 g/l
Fenol	2.0 g/l

Preparación del reactivo: Los reactivos se disolvieron en aproximadamente 600 ml de agua destilada, dejando al final el ácido 3,5 dinitrosalicílico, el cual se adicionó poco a poco hasta lograr su completa disolución, posteriormente se aforo a un litro con agua destilada.

Solución patrón de glucosa: La glucosa se secó previamente a una temperatura de 60°C durante 3 h y después se pasó al desecador. Se

pesó exactamente 1 g de glucosa anhidra y se diluyó en 700 ml de agua destilada, la solución se aforo a 1000 ml.

Preparación de la curva: De la solución de glucosa se hicieron diluciones tomando alícuotas de 1 hasta 10 ml en tubos de ensayo, completando el volumen en cada tubo a 10 ml con agua destilada. Estas soluciones tuvieron una concentración de 0.1 hasta 1.0 g/l.

Procedimiento: En tubos de ensayo se adicionaron 0.5 ml de muestra, 1.5 ml de solución de DNS, se agitaron en vortex y los tubos se colocaron en un baño de agua a punto de ebullición durante 15 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 8 ml de agua destilada y se agitaron. Se preparó un blanco de los reactivos bajo el mismo procedimiento de las muestras, pero en su lugar se adiciona agua destilada. Se leyó la absorbancia a 550 nm.

Cálculos: Los resultados de la curva de calibración se sometieron a un análisis de regresión lineal con el fin de obtener una ecuación donde se obtenga la concentración de azúcares reductores libres en una muestra a partir de una sustancia dada. Los resultados de absorbancia obtenidos en las muestras se introdujeron en la ecuación obtenida de la curva patrón para obtener el valor de la concentración, el cual se multiplicó por el factor de dilución y los resultados fueron dados en g/l.

4.10.2 Técnica espectrofotométrica para la determinación de etanol por dicromato de potasio (Bohriger y Jacob, 1964).

Reactivos utilizados

Dicromato de potasio	33.768 g
Ácido sulfúrico concentrado	325 ml
Agua destilada	1000 ml

Preparación del reactivo: Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada y se afora con agua destilada a 1000 ml.

Solución patrón de etanol: De acuerdo con la densidad y el porcentaje de pureza del etanol se calculó el volumen de alcohol que es necesario adicionar a 1 litro de agua destilada para obtener una solución de 20 g/l en este caso se utilizó etanol (J.T. Baker®) con una pureza de 99.6 %.

Preparación de la curva patrón de etanol: De la solución de etanol se hicieron 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 hasta 20 g/l. Se adicionó 1 ml de cada una por duplicado en tubos de ensayo y se determinó la concentración de etanol.

4.10.3 Preparación de la muestra

La muestra de mosto fermentado se centrifugó y el sobrenadante se destiló a fin de separar el etanol, los destilados se diluyeron dependiendo de la concentración de etanol estimada tomando en cuenta que la curva patrón llega hasta 20 g/l.

A 1 ml de muestra se agregaron 2 ml de solución de dicromato de Potasio se agitó, y se dejó reposar durante 10 minutos. Después se le adicionaron 5 ml de agua destilada, se agitó nuevamente y se leyó la absorbancia a 585 nm.

Cálculos: A los resultados de la curva de calibración fue necesario someterlos a un análisis de regresión lineal a fin de obtener una ecuación donde se obtenga la concentración de etanol en una muestra, a partir de una absorbancia dada. Los resultados de absorbancia obtenidos en las muestras se introdujeron a la ecuación obtenida de la curva patrón para obtener el valor de concentración, el cual se multiplicaron por el factor de dilución y los resultados fueron dados en g/l.

4.11 POBLACIÓN CELULAR

La medición de la población se hizo por conteo directo al microscopio por medio de la cámara de Newbauer que tiene una cavidad de dimensiones conocidas, contándose los microorganismos presentes en una porción de ese volumen.

4.12 CÁLCULOS

4.12.1 Crecimiento

Los datos obtenidos durante la cinética de crecimiento como el consumo de azúcares y el crecimiento de la población se utilizaron para obtener la siguiente información (Scriban, 1985).

Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}):

$$\frac{dx}{dt} = \mu * X \quad \mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt}$$

En donde:

dx - Velocidad de producción de biomasa

dt - Velocidad de consumo de sustrato

μ -Velocidad de crecimiento

X - Biomasa

Velocidad de consumo de sustrato:

$$\frac{ds}{dt} = r_s$$

En donde

dt - Velocidad de consumo de sustrato

d_s - Velocidad de producción de sustrato

r_s -Velocidad de consumo de sustrato

Tiempo de duplicación:

$$T_d = \frac{L(2)}{\mu_{\max}}$$

μ_{\max}

En donde:

T_d = Tiempo de duplicación

$L(2)$ =

μ_{\max} - velocidad máxima.

Los datos obtenidos de la producción de alcohol, y del consumo de azúcares durante la fermentación se utilizaron para la determinación de los parámetros cinéticos.

Así mismo, se calcularon otros parámetros para realizar el análisis estadístico posterior:

Constante de rendimiento formación de biomasa a partir del sustrato (Y

$\frac{x}{s}$);

$$Y_{x/s} = \frac{\text{PRODUCCION} \cdot \text{DE} \cdot \text{BIOMASA. (g / l)}}{\text{CONSUMO} \cdot \text{DE} \cdot \text{SUSTRATO. (g / l)}}$$

En donde:

$(Y_{x/s})$ - Rendimiento de biomasa

Etanol producido:

$$\text{ETOH} = \text{ETOH final} - \text{ETOH inicial}$$

Constante de rendimiento de producto $(Y_{p/s})$:

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

En donde:

$(Y_{p/s})$ - Rendimiento de producto

Eficiencia de fermentación:

$$E = \frac{Y_{p/s}}{0.52^*}$$

*Rendimiento máximo

teórico

En donde:

$(Y_{p/s})$ - Rendimiento de producto

E- Eficiencia

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

En la Figura 1 y 2 se observa la cinética de crecimiento para la levadura de panificación y vinificación en las diferentes edades de maduración del agave. Las cinéticas iniciaron con una población de 20 mll/cel/ml y a las doce horas se estabilizaron.

Para la levadura de panificación la población fue similar a las 14 h, excepto en la edad de ocho años con la menor población de 57 mll/cel/ml. La mayor población fue con la edad de seis años en donde se obtuvo una población de 90 mll/cel/ml (Fig. 1).

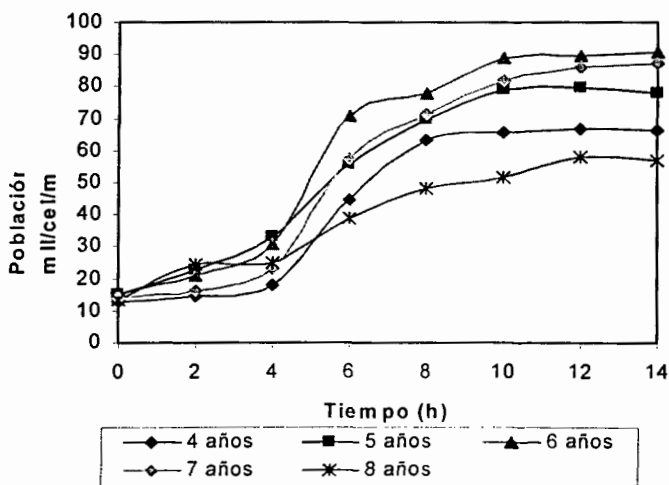


Fig. 1. Cinética de crecimiento de la levadura L-O22 (Panificación) en diferentes edades de maduración del agave.

Para la levadura de vinificación el tiempo de estabilización fue a las 12 h con una población de 80 a 90 ml/cel/ml, excepto con la edad de cuatro años de maduración que solo produjo con 45 ml/cel/ml (Fig. 2).

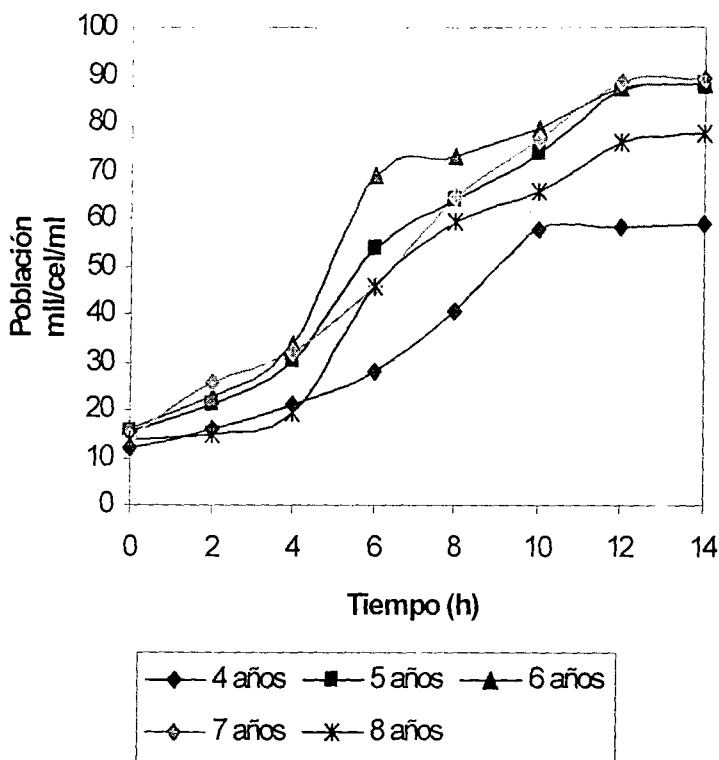


Fig. 2. Cinética de crecimiento de la levadura 46 EDV (Vinificación) en diferentes edades de maduración del agave.

En las Figs. 3 y 4 se muestran el consumo de azúcares durante la cinética de crecimiento para la levadura de panificación y de vinificación en las diferentes edades de maduración del agave. Estas iniciaron con 60 g/l de azúcares, excepto la de cuatro años que presento menos de 45 g/l. A partir de las 12 h se presentó el declive del contenido de azúcares para llegar a las 14 h con 10-20 g/l en las diferentes edades del agave. Por otro lado, el mayor contenido de azúcares fue para la de ocho años con 30.1 g/l y la cepa de panificación.

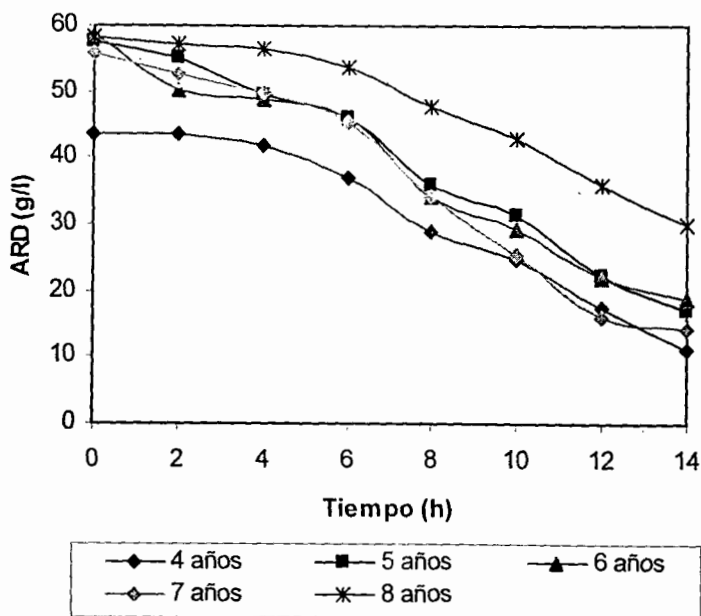


Fig. 3. Cinética del consumo de azúcares para la levadura de panificación.

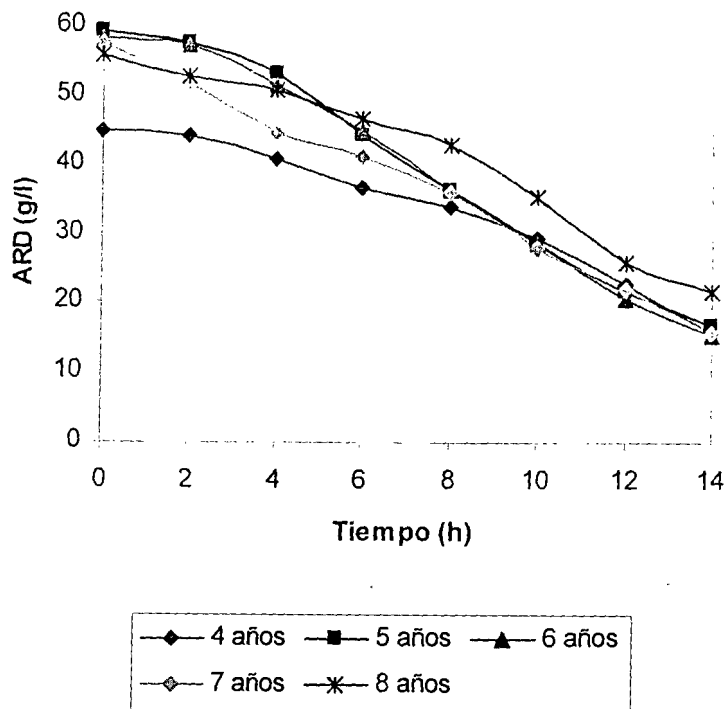


Fig. 4. Cinética del consumo de azúcares para la levadura de vinificación.

Los parámetros cinéticos bajo los cuales se comparó el crecimiento de las levaduras en las diferentes edades del agave fueron velocidad específica de crecimiento (μ), Consumo de sustrato (r_s) y tiempo de duplicación (T_d).

En el cuadro 1 se presenta la velocidad específica de crecimiento (μ) para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave. El análisis estadístico indicó que no existen

diferencias entre las cepas de levaduras así como en las diferentes edades de agave utilizadas (Cuadro 2).

La μ para la levadura de panificación y de vinificación fue de 0.2450 +/- 0.041 y 0.2873 +/- 0.014 a los 8 años de maduración, mientras que esta fue de 0.3896 +/- 0.050 y de 0.2989 +/- 0.136 a los 4 años de maduración, respectivamente. Al comparar la μ de las cepas estudiadas en este estudio con las de Bernal (1999) y Alba (2000) que caracterizaron mezclas y seis cepas de levaduras en donde la mayor velocidad específica de crecimiento fue de 0.717 y 0.478, se observa que la cepa de vinificación y panificación muestran una menor velocidad específica de crecimiento.

Cuadro 1 Velocidad específica de crecimiento (μ) para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave.

Edad del agave	μ de panificación h ⁻¹	μ de vinificación h ⁻¹
4	0.3896 +/- 0.050	0.2989 +/- 0.136
5	0.2868 +/- 0.046	0.2838 +/- 0.090
6	0.3560 +/- 0.110	0.2945 +/- 0.147
7	0.3305 +/- 0.007	0.2812 +/- 0.031
8	0.2450 +/- 0.041	0.2873 +/- 0.014

Cuadro 2 Análisis de varianza para la variable μ .

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media del cuadrado	Proporción F^{-}	Nivel de Significancia
Edad	0.658838	4	0.164729	0.78	0.5622
Levadura	0.140511	14	0.140511	0.67	0.4332
Interacción	0.960173	10	0.240043	1.14	0.3925
Residual	2.10711	19	0.210711		
Total corregido	3.8663				

La velocidad de consumo de sustrato (r_s) para la levadura de panificación y de vinificación en las cinco diferentes edades de maduración del agave se muestra en la Cuadro 3. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias entre las cepas de levaduras así como en las diferentes edades de agave utilizadas (Cuadro 4). La velocidad de consumo de sustrato para la cepa de panificación fue desde 3.080 +/- 0.283 en agave de 8 años, hasta 5.535 +/- 0.983 en 7 años. Para la cepa de vinificación fue de 3.955 +/- 0.926 y de 4.595 +/- 1.124 a los 8 y 6 años de maduración.

Bernal (1999) estudio mezclas de levaduras en la etapa fermentativa del proceso de producción de tequila, en donde la mayor velocidad de consumo de sustrato fue de 10.64 g/l en el presente

trabajo el resultado fue de 5.53g/l, por lo que las cepas evaluadas consumen menos cantidad de azúcares que las reportadas por Bernal.

Cuadro 3. Velocidad de consumo de sustrato (rs) para la levadura de panificación y de vinificación en las cinco diferentes edades de maduración del agave.

Edad	Consumo de sustrato (rs) (g/l/h)	
	Panificación	vinificación
4	3.48 +/- 0.488	4.160 +/- 2.206
5	4.040 +/- 0.792	4.205 +/- 0.785
6	4.400 +/- 1.075	4.595 +/- 1.124
7	5.535 +/- 0.983	4.570 +/- 1.315
8	3.080 +/- 0.283	3.955 +/- 0.926

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable consumo de sustrato (rs).

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media del cuadrado	Proporción F	Nivel de Significancia
Edad	3.52172	4	0.88043	0.49	0.5622
Levadura	0.00392	1	0.00392	0.00	0.4332
Interacción	1.45308	4	0.36327	0.20	0.3925
Residual	17.9329	10	1.79329		
Total corregido	322.9116	19			

El tiempo de duplicación para levadura de panificación y de vinificación se muestra en la Cuadro 5. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias entre las cepas de levaduras así como en las diferentes edades de agave utilizadas (Cuadro 6).

El tiempo de duplicación (Td) para la cepa de panificación en el jugo de agave de 4 años fue 1.79 ± 0.226 y para la edad de 8 años fue de 2.86 ± 0.488 para la levadura de vinificación fue de 2.41 ± 0.113 para la edad de 8 años y 2.68 ± 1.351 para la edad de 6 años. Alba (2000) y Bernal (1999) reportan tiempos de duplicación de las cepas de 3.12 y 2.86 h, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo para la cepa de panificación pero mas lenta al compararlas con la de vinificación.

Cuadro 5. Tiempo de duplicación (Td) para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave.

Edad	Tiempo de duplicación (h)	
	Panificación	Vinificación
4	1.79 ± 0.226	2.44 ± 0.983
5	2.44 ± 0.389	2.56 ± 0.813
6	2.03 ± 0.629	2.68 ± 1.351
7	2.09 ± 0.049	2.47 ± 0.276
8	2.86 ± 0.488	2.41 ± 0.113

Cuadro 6. Análisis de varianza para el tiempo de Duplicación (Td).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrado	Proporción F	Nivel de significancia
Edad	0.6410	4	0.160258	0.37	0.8275
Levadura	0.3645	1	0.3645	0.83	0.3831
Interacción	0.8528	4	0.213213	0.49	0.7456
Residual	4.3792	10	0.4379		
Total corregido	6.2375	19			

5.2 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

En la Fig. 5 se observa la cinética de fermentación de la cepa de vinificación, esto es la producción de alcohol así como el consumo de azúcares en el jugo de agave con las diferentes edades utilizadas. Las fermentaciones con la levadura de vinificación iniciaron con una concentración de alcohol de 2.5 g/l aproximadamente y se estabilizó la producción entre las 20 y 30 h de la fermentación, terminando entre 25 y 35 g/l de etanol. El contenido de azúcar inició entre 62 y 78 g/l y disminuyó hasta estabilizar su consumo a las 28 h excepto en la edad de 8 años que estabilizó su consumo a las 32 h.

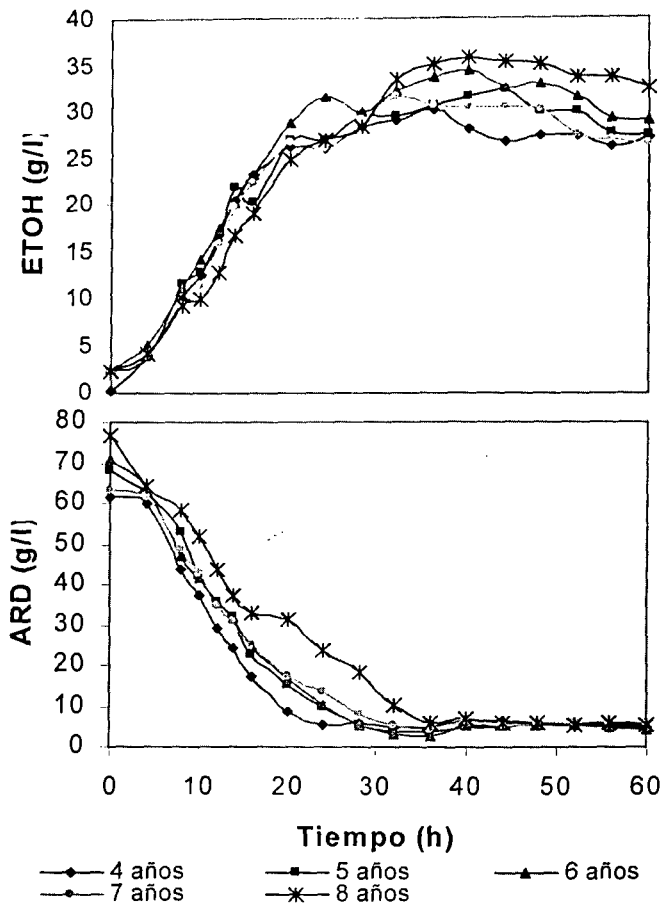


Fig. 5. Cinética de Fermentación levadura de vinificación

La Figura 6 muestra la cinética de fermentación y de consumo de azúcares de la cepa de panificación la cual se realizó con las cinco diferentes edades de maduración del agave, iniciando con la misma concentración de alcohol de 4 g/l, y a las 24 y 32 h de fermentación se

presentó la mayor producción de etanol con 35 g/l. A partir de 36 h de fermentación se estabilizó y se mantiene con 35 g/l.

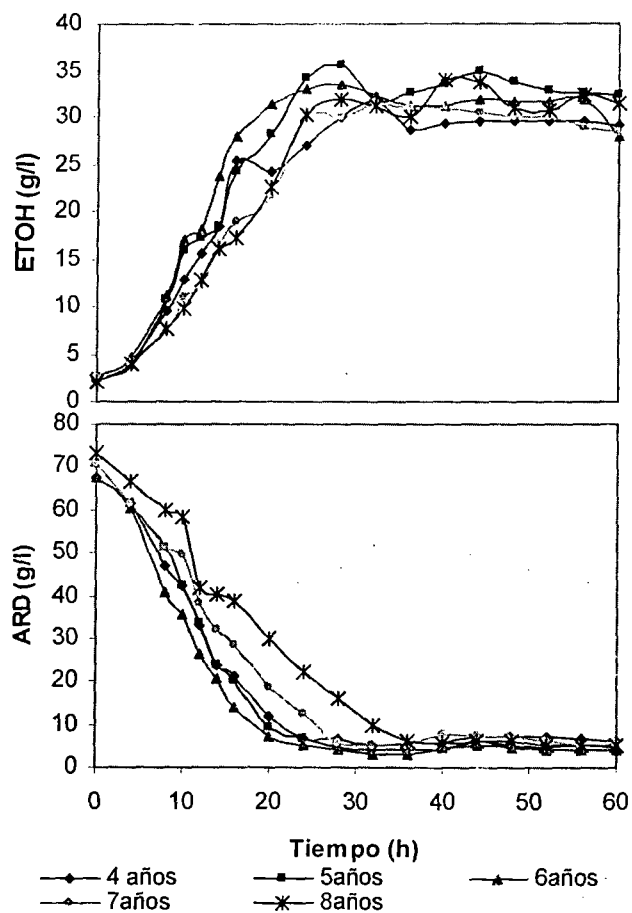


Fig.6 Cinética de producción de etanol y consumo de azúcares con la levadura de panificación.

El contenido inicial de azúcares en la cinética de fermentación fue de 70 a 72 g/l, y se observó la misma tendencia en cuanto al consumo de azúcares por parte de la cepa. Finalmente se estabilizó entre las 30 y 35 h de fermentación. Después de 70 h los jugos de agave con diferente tiempo de maduración presentaron la misma cantidad de azúcares.

Los parámetros cinéticos utilizados para la comparación de las cepas de levaduras en la fermentación de jugo de agave con diferentes edades del agave fueron rendimiento, eficiencia y productividad.

En el cuadro 7 se presenta el rendimiento para la levadura de panificación y de vinificación en diferentes edades de maduración del agave. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias entre las cepas de levaduras así como en las diferentes edades de agave utilizadas (Tabla 8). El rendimiento para la levadura de panificación fue de 0.4 ± 0.013 para la edad de 6 años y de 0.450 ± 0.011 para la edad de 5 años. La cepa de vinificación presentó un rendimiento de 0.400 ± 0.036 y 0.448 ± 0.019 para la edad de 6 y 4 años. Estos resultados indican que la edad del agave no afecta el rendimiento de las cepas. Alba (2000) caracterizó seis cepas de levaduras en el cual el rendimiento más alto fue de 0.490 g/l mientras que el menor rendimiento fue de 0.390 g/l. Lo que indica que el presente trabajo está dentro del rango de rendimiento de las cepas de levaduras caracterizadas.

Cuadro 7 Rendimiento de la levadura de panificación y de vinificación en 5 edades de maduración del agave.

Edad	Rendimiento (g/l)	
	Panificación	Vinificación
4	0.434 +/- 0.005	0.448 +/- 0.019
5	0.450 +/- 0.011	0.401 +/- 0.013
6	0.400 +/- 0.013	0.400 +/- 0.036
7	0.400 +/- 0.061	0.418 +/- 0.014
8	0.431 +/- 0.010	0.425 +/- 0.024

Cuadro. 8 Análisis de varianza para rendimiento

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrado	Proporción F	Nivel de significancia
Edad	0.004007	4	0.0010018	1.47	0.2815
	2				
Levadura	0.0028512	1	0.0001058	0.16	0.7016
Interacción	0.0028512	4	0.0007128	1.05	0.4302
Residual	0.006801	10	0.0003801		
Total corregido	0.0137652	19			

En el cuadro 9 se presenta la eficiencia para la levadura de panificación y vinificación en las cinco diferentes edades de maduración del agave. El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de maduración del agave y las dos cepas de levadura (Cuadro 10). La eficiencia de la levadura de panificación con la edad de 4, 5 y 8 años son estadísticamente iguales y son los que obtuvieron los valores superior a 85%, mientras que las edades de 6 y 7 años obtuvieron valores menores a 80%. y se considerándose iguales. Mientras que la eficiencia para la levadura de vinificación con las edades de cuatro, siete y ocho años obtuvieron valores superiores a 80, y las edades de cinco y seis años son estadísticamente iguales y obtuvieron valores menores a 80. Alba (2000) Caracterizó seis cepas en las cuales la eficiencia más alta fue de 96.09 y la eficiencia más baja fue de 76.47 lo que podemos observar en el presente trabajo es que la cepa si influye sobre la eficiencia mientras que la edad del agave no. Ya que en el presente trabajo no se obtuvieron eficiencias superiores a los 90.

Cuadro 9. Eficiencia para la levadura de panificación y vinificación en cinco diferentes edades de maduración del agave.

Edad	Eficiencia (%)	
	Panificación	Vinificación
4	85.04 +/- 1.022 ab	87.71 +/- 3.720 a
5	88.20 +/- 2.182 a	78.62 +/- 2.475 b
6	78.51 +/- 2.525 b	78.48 +/- 7.042 b
7	78.47 +/- 12.02 b	82.02 +/- 2.669 ab
8	84.47 +/- 1.824 ab	83.51 +/- 4.719 ab

Cuadro 10. Análisis de varianza para la eficiencia.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Proporción F	Nivel de significancia
Edad	156.851	4	39.2127	1.49	0.2582
Levadura	3.9524	1	3.9549	0.15	0.7042
Residual	368.521	14	26.3229		
Total corregido	529.324	19			

En el cuadro 11 se observa la producción de etanol en las cepas de Panificación y vinificación en cinco diferentes edades de maduración del agave. En el análisis de varianza se encontró diferencia significativa entre las diferentes edades de maduración del agave (Cuadro 12). Para la levadura de panificación las edades de cuatro, cinco, seis y siete años se consideran estadísticamente iguales por estar entre 25 y 26 g/l de etanol, mientras que por otra parte la edad de ocho años no se considera estadísticamente iguales ya que obtuvo mayor cantidad de etanol 29.26 ± 0.516 y en la cepa de vinificación tuvieron el mismo comportamiento obteniendo la edad de ocho años 30.21 ± 0.438 g/l. Alba (2000) caracterizo seis cepas de levaduras en donde la productividad más alta fue de 1.84 g/l/h y la productividad más baja fue de 0.79 g/l/h , mientras que en el presente trabajo la productividad fue muy baja ya que la más alta fue de 0.495 y la menor de 0.338 g/l/h lo que indica que el tipo de cepa influye sobre la productividad.

Cuadro 11. Producción de Etanol en las cepas de Panificación y vinificación en cinco diferentes edades de maduración del agave.

Edad	Etanol (g/l)	
	Panificación	Vinificación
4	26.64 +/- 1.527 a	25.33 +/- 0.552 ab
5	25.71 +/- 0.636 ab	25.18 +/- 1.018 ab
6	25.33 +/- 0.382 ab	26.50 +/- 2.008 a
7	25.77 +/- 2.312 ab	24.04 +/- 0.156 b
8	29.26 +/- 0.516 c	30.21 +/- 0.438 c

Cuadro 12. Análisis de varianza para la producción de Etanol.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrados	Proporción F	Nivel de significancia
Edad	56.2957	4	14.0739	9.99	0.0016
Levadura	5.96232	1	5.96232	4.23	0.0667
Interacción	21.5468	4	5.38671	3.82	0.0388
Residual	14.0867	10	1.40867		
Total corregido	97.8915	19			

5.4 CONTENIDO DE AZUCARES EN EL JUGO DE AGAVE POR HPLC.

En la Fig. 7 se muestra la concentración de azúcar en agave crudo, y se observa que la inulina es el azúcar mayoritario, seguido por la fructosa, dextrosa y sacarosa. Asimismo se presenta una tendencia a mayor edad del agave mayor concentración de azúcar, ya que el de 4 años presenta 100 g/l y el de 8 años 170 g/l.

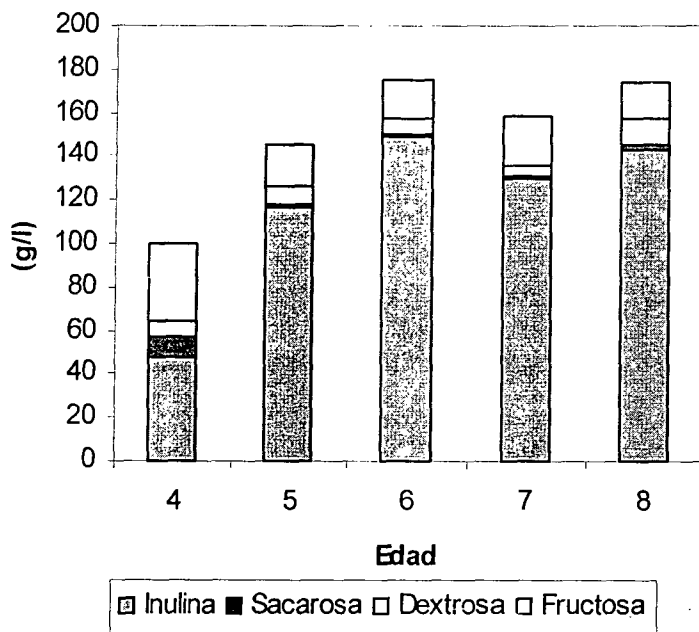


Fig. Contenido de azúcares en el jugo de agave crudo de diferentes edades de maduración.

En la Figura 8 se muestra el contenido de azúcares en el agave cocido. El azúcar que se encuentra en mayor proporción es la fructosa, seguida de la dextrosa y sacarosa; la inulina se observa en menor proporción que en agave crudo debido a la acción del cocimiento.

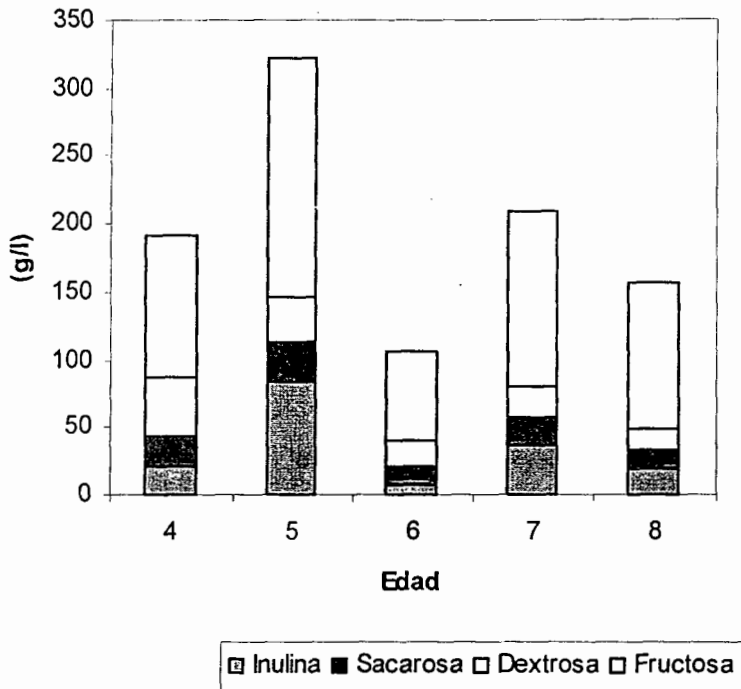


Fig 8. Contenido de azúcares en el jugo de agave cocido de diferentes edades de maduración.

6. CONCLUSIONES

6.1 CRECIMIENTO

- 6.1.1 No existe diferencia significativa entre velocidad de crecimiento y producción de consumo de sustrato ni en el tiempo de duplicación en las dos diferentes levaduras.
- 6.1.2 No existe diferencia significativamente entre velocidad de crecimiento, producción de consumo de sustrato y tiempo de duplicación (Td) entre las cinco diferentes edades del agave utilizadas.

6.2 FERMENTACIÓN

- 6.2.1 Estadísticamente no hay diferencia significativa entre Eficiencia, rendimiento, y alcohol producido entre la levadura de panificación y la de vino.
- 6.2.2 Estadísticamente no existe diferencia significativa entre eficiencia y rendimiento de las cinco diferentes edades del agave analizadas.
- 6.2.3 Estadísticamente si existe diferencia significativa en alcohol producido de las cinco diferentes edades analizadas.
- 6.2.4 El jugo de ocho años tuvo más producción de etanol.

6.3 HPLC

- 6.3.1 El agave tiene inulina, sacarosa, dextrosa y fructosa.
- 6.3.2 El jugo de agave crudo tiene mayor cantidad de inulina seguido por la fructosa, dextrosa y en menor proporción contiene sacarosa.
- 6.3.3 El jugo de agave cocido tiene mayor cantidad de fructosa, seguido por la inulina y en menor proporción la sacarosa y dextrosa.
- 6.3.4 La diferencia en la concentración de azúcar entre las muestras agave crudo y cocido presentados se debe a que eran muestras diferentes.

7. LITERATURA CITADA

- Alcala-García M. R., 1994. Evaluación de la tolerancia al etanol de dos cepas de levaduras parentales y una termotolerante. Tesis de Licenciatura en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, U. de G.
- Alba-Gallegos M., 2000. Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento y de fermentación de levaduras aisladas a partir de jugo de agave. Tesis de Licenciatura en Ciencias Químicas, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería.
- Alvarez de la Cuadra J., ¿Gusta usted un tequila? Información científica y tecnológica Consejo Nacional de ciencia y tecnología., 18 (232) pp. 43-51 1996.
- Bailey J., E Ollis David F., Biochemical Engineering Fundamentals, Ed. Mc Graw Hill, pp. 394-403, 1986.
- Bernal-Abascal S. 1999. Estudio de la generación de compuestos organolépticos por mezclas de levaduras en la etapa fermentativa del proceso de producción del tequila. Tesis de Licenciatura Ingeniero en alimentos, Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Bohringer P. y Jacob L., 1964. The Determination of Alcohol Using Chromic Acid., Zeitschr Fluddiges, pp. 2333.
- Cedeño, C. M., 1993. Overview of Tequila Production with an Emphasis on the role of Yeast, Distilled Beverage industry Fermentation Technology, pp. 87-82.
- Cedeño, C. M. 1995. Tequila production. Critical Reviewa in Biotechnology. 15: 1-11.

- Crueger W. y Crueger A., 1984. *Biotechnology A Textbook of industrial Microbiology*, Ed. Sinauer Associates, Inc./ Science Tech, inc., pp. 54-61.
- García A. I., García L.A y Diaz M., 1993. Fusel alcohols production in beer fermentation process *Biocemistry* 29:303-309.
- Gómez-Cordovés C. y Bartolomé B., 1993. Application of principal component analysis to simple determinations of bradies as a means of verifying quality. *Z. Lesbensm. Unters Forsch.* 197: 260-263.
- González-Gutiérrez L., 2000. Evaluación de los compuestos organolépticos formados durante la fermentación de 6 mezclas utilizando dos levaduras, Tesis de Licenciatura en Ciencias Químicas, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería.
- Serdio E. 2002., <http://www.reservaycata.com/espanol/prensa453.htm>
'Protagonistas: las levaduras. Estrella invitada: el hombre.
- Latorre M. J., C., García-Jares, B. Medina y C. Herrero, 1994. Pattern Recognition analysis applied to clasifcation of wines from Galicia (Nortwestern Spain) whit certified brad of origin. *J. Agri. Food Chem.* 42: 1451-1455.
- Leveau J.Y, y M. Bouix, 2000. Los microorganismos de interés industrial, *Microbiología industrial*, Ed. acribia. 1:129-182.
- Miller G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem*, 31 (3) 426-428.
- Mulet A., Bernal A. y Forcén M. 1992. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts and wines from Majorcan origin. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 221-226.
- Pelczar M. y J. Reid, 1997. *Microbiología* Ed. MC. Graw Hill, pp. 272-287 1997.

Santos C., Muñoz S.S., y Gutierrez Y 1985. Fermentation kinetics and production of volatiles during alcoholic fermentation. J. Amer. Soc. Brew. 53:72-78.

Secofi, Norma oficial Mexicana NOM- 006-SCFI 1994. Bebidas alcohólicas, Tequila., especificaciones. Diario oficial de la federación, miércoles 3 de septiembre de 1997.

Scriban R., 1985. Biotecnología, Editorial el manual moderno. Segunda edición.