INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

Informe Técnico de Residencia Profesional

"Optimización de la elaboración de una bebida espirituosa empleando como materia prima a los destilados de la fermentación de mieles de *Agave americana* L. y levaduras autóctonas"

Presenta:

Rodríguez Vázquez Sonia Areli.....08270028

Asesora:

M. C. Lucía María Cristina Ventura Canseco

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y BIOQUÍMCA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; A 10 DE ENERO DEL 2013.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....5

2 JUSTIFICACIÓN.....6

3 OBJETIVOS.....7
3.1 OBJETIVO GENERAL.....7
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....7

4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.....8

5 PROBLEMAS A RESOLVER.....9

6 ALCANCES Y LIMITACIONES.....10

7 MARCO TEÓRICO.....11
***7.1 Agave americana* L.**.....11
7.1.1 DESCRIPCIÓN.....11
7.1.2 DISTRIBUCIÓN.....13
7.1.3 HÁBITAT Y FENOLOGÍA.....14
7.1.4 NOMBRE COMÚN Y USOS.....15
7.2 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....15
7.2.1 VARIABLES QUE AFECTAN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....17
7.2.1.1 Temperatura.....17
7.2.1.2 pH.....18
7.2.1.3 Aireación.....18
7.2.2 EFECTO DEL SULFATO DE AMONIO SOBRE LA FERMENTACIÓN.....19
7.3 LEVADURAS.....20
7.3.1 MORFOLOGÍA.....21
7.3.2 REPRODUCCIÓN.....22
7.3.2.1 Asexual.....22
7.3.2.2 Sexual.....23
7.3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....24
7.3.4 REQUERIMIENTOS NATURALES.....24
7.3.5 CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS PARA EL CRECIMIENTO.....25
7.3.6 ESTUDIO DE LAS LEVADURAS EN EL LABORATORIO.....26

7.3.7 FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LAS LEVADURAS……27
7.3.7.1 Osmotolerancia……27
7.3.7.2 Tolerancia a etanol……..29
7.3.8 AZÚCARES FERMENTABLES……32
7.3.9 FENOTIPO KILLER……..34
7.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L. y miel de panela……..35
7.5 DESTILACIÓN ALCOHÓLICA……..37
7.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES……38

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS……39
8.1 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L.……39
8.1.1 TOMA DE MUESTRA……39
8.1.2 TRANSPORTE……..39
8.1.3 CULTIVO ENRIQUECIDO……39
8.1.4 RESIEMBRA……39
8.1.5 AISLAMIENTO……40
8.1.6 SELECCIÓN DE COLONIAS……40
8.1.7 CULTIVO EN MEDIO SELECTIVO (WL)……..40
8.1.8 RESIEMBRA EN TUBO……40
8.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS AISLADAS……40
8.2.1 PRUEBA DE AZÚCARES FERMENTABLES……..…40
8.2.2 EFECTO KILLER……...41
8.2.3 PRUEBA DE OSMOTOLERANCIA……..41
8.2.4 PRUEBA DE TOLERANCIA A ETANOL……...42
8.2.5 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL (MÉTODO DE OXIDACIÓN DE DICROMATO)……42
8.3 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA FERMENTACIÓN EMPLEANDO MIELES DE AGAVE PANELA……..…43
8.3.1 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO……..43
8.3.2 SEMILLEO……..…43
8.3.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA……...43

8.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO EL DENSÍMETRO ……..……44

8.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES……..44

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES……..……45
9.1 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L**……45**
9.2 PRUEBA DE AZÚCARES FERMENTABLES……..**48**
9.3 EFECTO KILLER……...**51**
9.4 PRUEBA DE OSMOTOLERANCIA……**53**
9.5 PRUEBA DE TOLERANCIA A ETANOL……**55**
9.6 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL (MÉTODO DE OXIDACIÓN DE DICROMATO)……**57**
9.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO EL DENSÍMETRO……**58**
9.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES……..**59**

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……61

11. ANEXOS……62
11.1 CURVA PATRÓN DE DICROMATO……**62**
11.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SEMILLEO**…62**

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……64

1. INTRODUCCIÓN

Las bebidas espirituosas son aquellas bebidas alcohólicas destinadas al consumo humano obtenidas por destilación, en presencia o no de aromas, de productos naturales fermentados, o por maceración de sustancias vegetales, con adición o no de aromas, azúcares, otros edulcorantes, u otros productos agrícolas y cuya graduación alcohólica es superior al 15% v/v.

Existe una gran variedad de bebidas espirituosas en función de las materias primas destiladas, de los aromatizantes o de los complementos utilizados en su elaboración.

Entre esta variedad de bebidas alcohólicas, están las siguientes: Whisky, Ron, Ginebra, Vodka, Brandy, Orujo y Anís (Rodríguez y Magro, 2008).

En México existen bebidas destiladas que poseen denominación de origen, estas se obtienen a partir de mostos fermentados de diferentes especies de agaves, que son las siguientes: el proceso de elaboración del tequila es a partir de *A. Tequilana* Weber, el mezcal de *A. Angustifolia, A. Potatorum y A. Salmiana*, y la bacanora de *A. Angustifolia* (Trueba, 2007).

Una de las plantas que crece y se adapta muy bien a tierras áridas y secas de nuestro territorio es el *Agave americana* L., planta comúnmente conocida en muchos lugares de nuestro país como maguey, pajpa o cabuya. Esta planta es originaria de México y en la actualidad crece casi en todo los valles interandinos del Perú, también crece en muchos países en los cuales se le ha estudiado y dado mayor importancia principalmente con fines medicinales.

Desde el punto de vista alimenticio, actualmente destaca el consumo del "aguamiel", que es un exudado de esta planta obtenido por procedimientos artesanales. El "aguamiel" en nuestro país es conocido popularmente con los nombres de caldo de maguey, líquido de maguey o dulce de maguey; su consumo se está extendiendo por casi todo los lugares donde crece la planta (Cruz, 2006).

El aguamiel utilizada para la fermentación alcohólica, contiene carbohidratos, proteínas, minerales como: sodio, potasio, magnesio, calcio, fósforo, fierro, zinc, cobre y vitamina C. Las levaduras fermentan los azúcares presentes en el aguamiel convirtiéndolo en dióxido de carbono y etanol (Macarulla y Goñi, 1994).

2. JUSTIFICACIÓN

El agave comiteco, como lo indica su nombre crece en la ciudad de Comitán de Domínguez, Chiapas, y la población de esta zona ha aprendido a aprovecharlo como un recurso natural para obtener el "Comiteco", bebida que además de significar una tradición por la cual es reconocido Comitán, es una fuente de recursos económicos para la población, por ello debe aprovecharse al máximo, pues su uso irracional la ha llevado a considerarse hoy en día como una planta amenazada (de la Peña, 2008).

La elaboración del "Comiteco" se ha mantenido de manera artesanal y con variantes en el proceso de elaboración, debido a que no se tiene control sobre las variables que pueden afectar directamente la calidad del producto final, en varias ocasiones se obtienen altibajos en la misma, por ello se tiene el propósito de llevar a cabo la estandarización de los parámetros en el proceso.

Para que un proceso fermentativo tenga éxito es indispensable utilizar materias primas de alta calidad, que proporcionen a las levaduras todos los nutrimentos para su óptimo crecimiento.

Durante mucho tiempo se ha utilizado la levadura comercial para el proceso de fermentación, debido a esto, se pretende aislar levaduras del aguamiel para evaluarlas y caracterizarlas en función de su capacidad fermentativa y así lograr seleccionar una de ellas; al ser ésta una cepa autóctona, se le dará mayor importancia a la elaboración de esta bebida.

Otro interés es el de conocer y caracterizar los componentes del destilado, y así tener la certeza de su composición, asegurando la calidad de la bebida para su consumo, todo esto con el fin de darle un valor económico atractivo al proceso.

Previo a este trabajo Ana Karen Espinoza Arrioja y Ana Laura Guzmán Rabasa aislaron cepas de levaduras del aguamiel en el año 2011 con el objetivo de optimizar la fermentación para la producción de etanol en la empresa Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C.V., empleando mieles de agave y panela como sustratos en la fermentación. De cinco cepas que aislaron, dos de ellas A1 y A3 obtuvieron mejores rendimientos en base a la producción de etanol, sin presentar diferencia significativa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar y caracterizar una bebida espirituosa empleando levaduras aisladas de aguamiel y un mosto de fermentación a base de mieles de *Agave americana* L.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar levaduras nativas provenientes del aguamiel de *Agave americana L.*
- Caracterizar a las levaduras aisladas empleando pruebas de tolerancia a etanol, osmotolerancia, fermentación de azúcares y efecto killer.
- Seleccionar las cepas de levaduras aisladas que posean características óptimas de producción de etanol y fermentación de azúcares.
- Estandarizar el protocolo de semilleo, para la fermentación etanólica, utilizando la levadura aislada, a partir del aguamiel.
- Cuantificar el contenido de etanol en los destilados obtenidos de la fermentación empleando el densímetro (Anton Paar DMA 4500 M).
- Caracterizar los componentes de los destilados empleando CG.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Investigación y en el Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles, localizados en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080, bajo el cargo del Ing. José Luis Méndez Navarro.

El laboratorio de Investigación cuenta con cámara de inoculación, microscopios, incubadoras, balanzas analíticas, estufas de secado y de vacío, autoclaves, cámaras de refrigeración, materiales de vidrio, mecheros, reactivos, refractómetros, parrillas de calentamiento, equipos de destilación (Corning), etc.

En el Polo Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas de Biocombustibles cuenta con equipos para evaluar la densidad y viscosidad (Viscosímetro SVM 3000 Stabinger®), refrigeradores y equipos de destilación (Corning marca Pyrex®). También cuenta con laboratorios individuales destinados para recepción de materia prima, cromatografía, destilación, espectroscopia infrarroja, microbiología, etc.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

Este proyecto tuvo la finalidad de optimizar la elaboración de una bebida espirituosa empleando como materia prima a los destilados de la fermentación de mieles de *Agave americana* L. y levaduras autóctonas del aguamiel, evaluando diferentes proporciones de mieles de agave y panela, empleando una levadura aislada previamente.

Se realizó el aislamiento de levaduras provenientes del aguamiel eligiendo la cepa con mejor capacidad de fermentación de azúcares, tolerancia a etanol y osmotolerancia, para la obtención de una bebida espirituosa con características organolépticas únicas y específicas del *Agave americana* L., agradable al consumidor.

Fue relevante conocer las proporciones ideales de mieles de agave y panela en base a la producción de alcohol, pues las características sensoriales de la bebida son proporcionadas en gran parte por el agave, por lo que es importante conocer la composición química de las mieles.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

El desarrollo de este proyecto de residencia nos permitió alcanzar los objetivos establecidos con respecto a la metodología planteada, como son la caracterización de las mieles, estandarización del protocolo de semilleo, aislamiento de levaduras autóctonas, pruebas de tolerancia a etanol, osmotolerancia, fermentación de azúcares y efecto killer, fermentación a distintas proporciones de mieles, cuantificación y caracterización de los destilados obtenidos de la fermentación etanólica, entre otras.

Dentro del proyecto nos encontramos con algunas limitaciones como son el tiempo de espera de la etapa fenológica óptima de la planta de agave comiteco para la posterior recolección de aguamiel; seguida de esto, fue su traslado al laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 *Agave americana* L.

La familia Agavaceae es endémica de América, se distribuye desde el sur de Estados Unidos de América a Colombia y Venezuela, y está conformada por nueve géneros y 340 especies. El centro de mayor riqueza y diversidad biológica se encuentra en México, donde se encuentran 261 especies (75% del total) con 177 endémicas (70%) (Reynoso *et al.*, 2011).

El género más grande y diverso es Agave *spp.,* con 159 especies, de las cuales 119 son endémicas de México, representando 74%. Dentro de las aplicaciones más importantes de los agaves o magueyes por los grupos humanos está su uso como fuente de fibras duras, alimentación y elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas (Reynoso *et al.*, 2011).

7.1.1 DESCRIPCIÓN

Pertenece al grupo Americanae propuesto por Gentry (1982) y se reconoce por tener rosetas de hasta dos metros de alto, 2.5-3.0 m de diámetro, hojas de 1.5-2.0 m de largo, 15-25 cm de ancho, lanceoladas, ligeramente espatuladas, erectas y en ocasiones poco curvadas, acanaladas en el haz, glaucas, y de superficie ligeramente áspera y margen ondulado a crenado; dientes sobre mamilas, en la parte media de 0.5-1.0 cm de largo, 0.6- 1.2 cm de ancho, rectos o recurvados; espina terminal 3.5-4.0 cm de largo. Inflorescencia paniculada, laxa de 6-9 m alto, contorno general ovalado, fértil desde la mitad o el tercio superior, ramas primarias 20-35, 1-1.2 m largo; pedúnculo verde-glauco, brácteas del pedúnculo 30-60 cm largo, base hasta 10 cm ancho, triangulares, cactáceas, margen entero, espina 1-1.5 mm largo. Flores 6-7.5 cm largo, hipocrateriformes, verde-amarillentas; tépalos 2.5-3.5 cm largo, oblongos, gruesos, tubo del perigonio 1-1.5 cm largo, ovario 2.5-3 cm largo, cuello 2-5 mm; estambres con filamentos 5.5-8.0 cm largo, insertos en la parte media del tubo. Cápsulas 4.0-5.5 cm largo, 2.0- 2.5 cm ancho; semillas 9-10 mm largo, 7-8 mm ancho, negras (Figuras 1 y 2).

Figura 1. Plantas de *Agave americana L.*, en la región de Comitán, Chiapas

Figura 2. Morfología vegetativa y reproductiva de *Agave americana L.*, en la región de Comitán, Chiapas

Agave americana L. se utiliza también para la extracción de aguamiel y la elaboración de pulque. En Chiapas es la especie que se usa primordialmente para la elaboración del licor comiteco. En Oaxaca, la variedad hortícola de *Agave americana*, conocida como "maguey arroqueño", se emplea para la producción

de mezcal (Espinosa *et al*., 2002).

Agave americana L. es una especie polimórfica con numerosas formas cultivadas en varias regiones del mundo y que han sido seleccionadas y manejadas por el hombre durante miles de años. La variación intraespecífica observada incluye variación en el tamaño de la planta, número y forma de las hojas, disposición de las mismas en el espacio, forma del margen, tamaño de los dientes, y tamaño de la espina terminal; sin embargo, podemos reconocerla por la siguiente combinación de caracteres: hojas lanceoladas a algo espatuladas, erectas, recurvadas o reflejas, glaucas, a veces con bandas transversales verdosas, superficie ligeramente áspera al tacto, margen ondulado a crenado, dientes no mayores de un centímetro de largo y espina terminal corta, hasta de 4 cm de largo; flores de 6-7.5 cm de largo con el ovario más corto que el tubo y los tépalos. A este respecto, Gentry (1982) reconoce una subespecie y ocho variedades.

7.1.2 DISTRIBUCIÓN

Agave americana L. es una especie nativa del sur de los Estados Unidos de América y México, ampliamente cultivada en todo el mundo. En Chiapas se observa en los municipios de Venustiano Carranza, Comitán de Domínguez y Las Rosas (Figura 3). Las localidades, las coordenadas geográficas, la altitud y el mapa de distribución, se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación de localidades con plantaciones de *Agave americana*

Localidad	Municipio	Latitud norte	Longitud oeste	Altitud (msnm)
Agua Bendita	Venustiano Carranza	16° 14’28.4’’	92°25’30.5’’	632
Chacajolcom	Comitán	16°18’17.59’’	92°11’08.56’’	1820
Ejido Las Flores	Comitán	16°13’19.4’’	92°08’54.5’’	1715
Los Riegos	Comitán	16°18’21.1’’	92°07’29.5’’	1605
NE de la Ciudad de Comitán	Comitán	16°15’40.7’’	92°08’11.5’’	1643
San José de Las Rosas	Comitán	16°23’58.2’’	92°12’46.6’’	2251
Tuilaito Punta de Diamante	Comitán	16°16’24.90’’	92°09’56.1’’	1858
Yalpalé	Las Rosas	16°19’40.6’’	92°24’36.5’’	1010

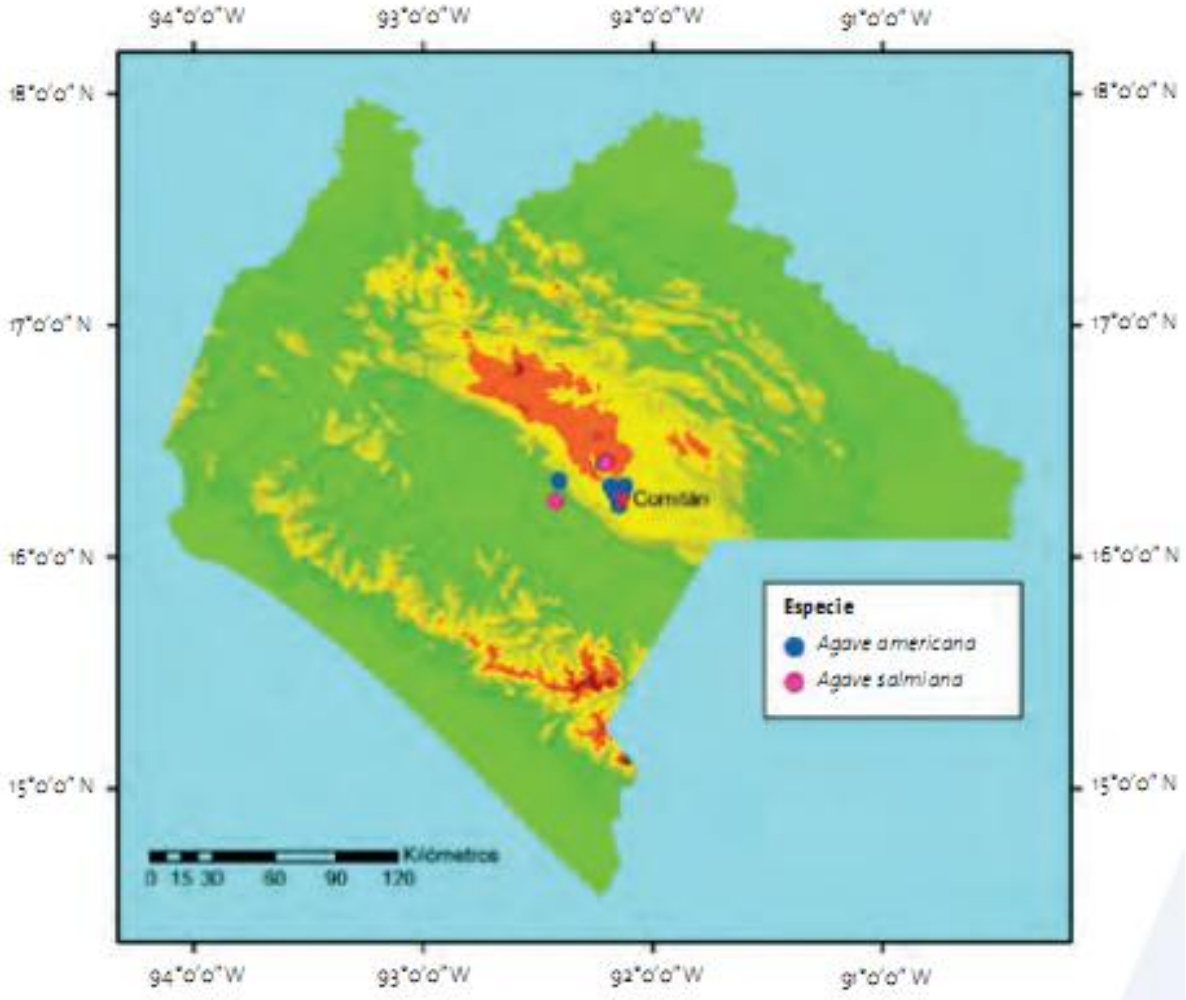


Figura 3. Ubicación de plantaciones de *Agave americana* L. y *Agave salmiana* en la Meseta Comiteca de Chiapas

7.1.3 HÁBITAT Y FENOLOGÍA

Cultivada como ornamental en pueblos y ciudades de México. En Chiapas crece preferentemente en altitudes entre los 1,000 y 1,860 msnm de altitud. En general, se observó que las plantas prosperan en laderas de roca caliza, sitios inclinados y terrenos con pendiente suave, en lugares abiertos, rocosos y suelos pedregosos. En los alrededores donde se cultiva se puede observar vegetación secundaria derivada de la selva baja caducifolia y sólo en la localidad de San José de las Rosas la vegetación circundante consiste de bosque de Pinus-Quercus. Estas especies de agave florecen entre los meses de Julio y Agosto (Reynoso *et al.*, 2011).

7.1.4 NOMBRE COMÚN Y USOS

"Maguey comiteco en Chiapas. Ornamental, como cerco vivo, quiotes secos empleados en la construcción. Se utiliza también para la extracción de aguamiel y la elaboración de pulque. En Chiapas es la especie que se usa primordialmente para la elaboración del licor comiteco. En Oaxaca, la variedad hortícola de *Agave americana* L. conocida como "maguey arroqueño" se emplea para la producción de mezcal (Espinosa *et al.* 2002).

7.2 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica, es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire (anaerobio), originado por la actividad de algunos microorganismos que transforman los hidratos de carbono (azúcares como: la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono, en forma de gas y unas moléculas de ATP (Figura 4) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Campbell y Reece, 2007).

Proceso bioquímico de la fermentación alcohólica

La reacción global de la conversión de glucosa a etanol es:

$$\textbf{Glucosa} + 2\,P_i + 2\,ADP + 2\,H^+ \longrightarrow 2\,\textbf{Etanol} + 2\,CO_2 + 2\,ATP + 2\,H_2O$$

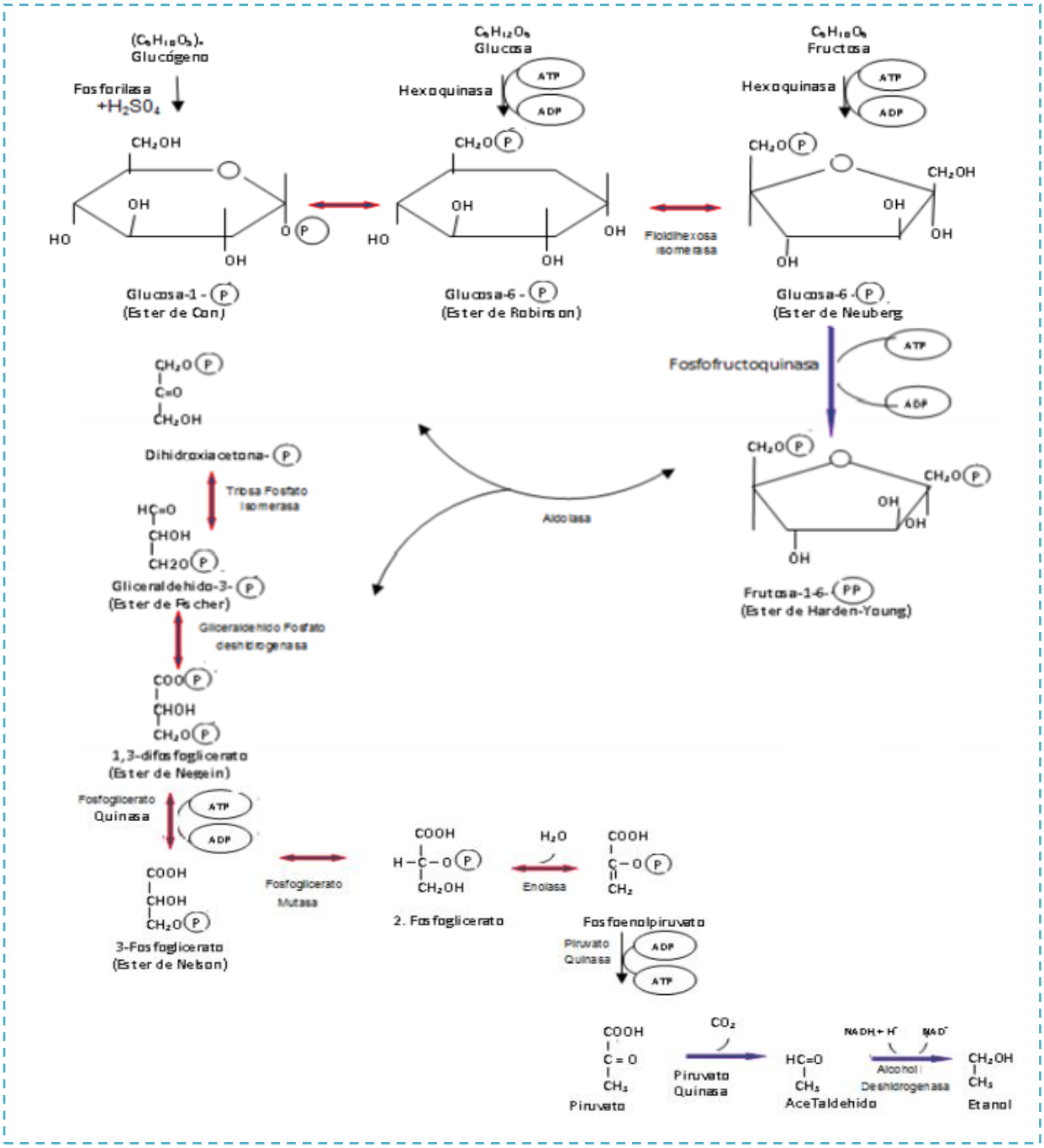


Figura 4. Reacciones comprendidas en la fermentación alcohólica de la levadura

El piruvato se convierte en etanol (alcohol etílico) en dos pasos (Figura 5). El primer paso libera dióxido de carbono del piruvato, que se convierte en el compuesto de dos carbonos, acetaldehído. En el segundo paso, el acetaldehído es reducido por el NADH a etanol. Esto regenera la provisión de NAD^+ necesaria para la continuación de la glucólisis. Muchas bacterias llevan a cabo la fermentación alcohólica e condiciones anaeróbicas. La levadura (un hongo) también lleva a cabo la fermentación alcohólica. Durante miles de años los seres humanos han empleado las levaduras en la fabricación de cerveza, de vinos y en la panificación (Campbell y Reece, 2007).

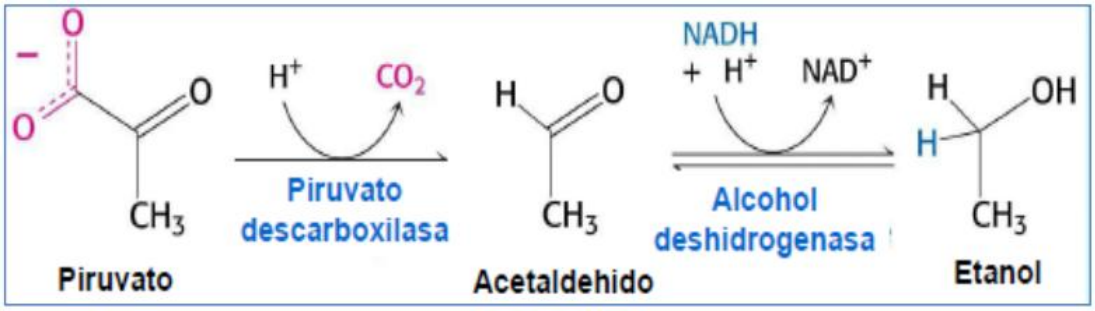


Figura 5. Conversión del piruvato a etanol

7.2.1 VARIABLES QUE AFECTAN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación es un proceso determinante en la composición final del producto fermentado. Son muchos los factores que influyen en el desarrollo de una fermentación: Temperatura, pH y aireación.

7.2.1.1 Temperatura

La temperatura es el factor de influencia decisiva para las actividades de las levaduras. La temperatura más adecuada para su reproducción y la fermentación oscila entre 22°C a 27°C y se reproduce con mayor rapidez cuando la temperatura es de 25°C. A temperaturas superiores a 30°C, las levaduras pierden capacidad para desdoblar los azúcares y al aproximarse a 40°C dejan de crecer y reproducirse. En una fermentación alcohólica nunca se debe superar temperaturas de 32°C durante el periodo fermentativo ya que se corren varios riesgos:

- Inactivación de las levaduras responsables de la transformación de los azúcares en alcohol y CO_2.
- Pérdida de alcohol por evaporación con merma de grado alcohólico.

- Iniciación de fermentaciones indeseables.

La influencia de la temperatura sobre el poder fermentativo, medida del porcentaje de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir, es diferente. Cuando se fermenta a temperatura baja o moderada las fermentaciones son lentas, pero el grado alcohólico alcanzado es generalmente mayor que a temperaturas elevadas o superiores a los 30°C ó 35°C (Ramírez y Pedroza, 2001).

Además las fermentaciones alcohólicas efectuadas a 25°C obtienen mejores resultados que las efectuadas a 30°C ya que:

El crecimiento de los microorganismos, muestra que a 25°C la levadura se desarrolla a un 25.5% más que a 30°C; el consumo de sólidos solubles, sacarosa y grado alcohólico a 25°C es de 42.8%, 71.0% y 7.3°GL respectivamente mientras que a 30°C es de 36.4%, 63.8% y 6.0°GL (Ramírez y Pedroza, 2001).

7.2.1.2 pH

El crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación no se ve afectado por la variación de pH entre 3.5 y 6.0 en el medio, pero a valores de pH entre 3.05 hasta 3.50 en el medio, se logra alcanzar un máximo de rendimiento de acuerdo a la formación de producto y crecimiento de la levadura (Ramírez y Pedroza, 2001).

En una fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8, rango que depende básicamente de la composición del medio a ser fermentado. Se establece que el pH en valores menores que 3.0 en un proceso fermentativo, se presenta el fenómeno de inhibición por pH, el cual se debe al efecto que esta variable tiene sobre los centros activos de las enzimas (Ramírez y Pedroza, 2001).

La marcha fermentativa depende además del pH del medio y los productos que resultan son mejores en cuanto a rendimiento a valores de pH bajos. También algunas de sus características organolépticas tales como color y sabor están reguladas por el pH del medio (Ramírez y Pedroza, 2001).

7.2.1.3 Aireación

Aunque la producción de etanol no requiere de oxígeno, en los primeros momentos de la fermentación, es necesaria aún la agitación y aireación para

procurar una dispersión homogénea de la porción iniciador (mosto más inóculo) en los tanques de fermentación y la oxigenación para la reproducción de las células de levadura en condiciones óptimas. Una aireación sumamente excesiva es totalmente absurda ya que no obtendríamos alcohol sino agua y anhídrido carbónico debido a que las levaduras, cuando viven en condiciones aeróbicas, no utilizan los azúcares por vía fermentativa sino oxidativa, para obtener con ello mucha energía y, por lo tanto, mayor cantidad de células (Jurado y Sarzosa, 2009).

La fermentación con agitación es ligeramente más rápida que la fermentación sin agitación. A pesar de ello, los niveles finales de etanol y azúcar obtenidos son similares en ambas condiciones de operación, observándose un ligero aumento en el grado alcohólico y el azúcar residual en la fermentación sin agitación (Jurado y Sarzosa, 2009).

7.2.2 EFECTO DEL SULFATO DE AMONIO SOBRE LA FERMENTACIÓN

La composición de nitrógeno de los mostos afecta el crecimiento y el metabolismo de las levaduras, la velocidad de fermentación y la terminación de la fermentación. La deficiencia de nitrógeno es una de las causas principales (Beltrán *et al*, 2005). En caso de carencias nitrogenadas, el crecimiento de las levaduras se ve limitado lo cual contribuye a un incremento del riesgo de fermentaciones con finales muy lentos o incluso, término de la fermentación. El estrés provocado por este tipo de carencias tiene así mismo un impacto en las cualidades aromáticas de las bebidas, siendo el nitrógeno indispensable para la síntesis de los aromas fermentativos (ésteres y alcoholes superiores) (Ehsani *et al.*, 2001). Un camino para evitar esos problemas es la adición de suplementos nutricionales, usualmente formas inorgánicas de nitrógeno tales como sales de amonio (Beltrán *et al*, 2005).

El sulfato de amonio y sulfato diamónico son las sales más utilizadas como fuente de nitrógeno, ya que aportan, al mismo tiempo, azufre y fósforo que la célula necesita. El ión amonio es empleado por las levaduras para la formación del ácido glutámico que actúa como donador de un grupo amino para la síntesis de otros aminoácidos para la célula (Aguilar, 1998).

El nitrógeno afecta a las células de levadura de dos maneras: aumenta la producción de biomasa y estimula la tasa de utilización de azúcar. Las adiciones de nitrógeno durante el periodo de crecimiento celular tienen como resultado poblaciones máximas de células. Posteriormente, las adiciones durante la fase

estacionaria no han tenido ningún efecto sobre la población celular pero tiende a incrementar la velocidad específica de fermentación, reduciendo así el periodo de fermentación (Beltrán *et al*, 2005).

Previamente, ha sido reportado el uso del sulfato de amonio por Ancona (2006) y Pérez (2007), quienes encontraron que en levaduras de géneros S*accharomyces y Candida*, a concentraciones mayores a 4 g/L de sulfato de amonio estas presentaban un efecto de inhibición debido al exceso de este componente en el medio de cultivo.

Es así mismo importante tener en cuenta que un excesivo aporte de nitrógeno en forma mineral (sales de amonio) puede llevar a problemas fermentativos al favorecer una producción excesivamente rápida e importante de biomasa de levaduras. Si la población es excesivamente importante al inicio de la fermentación, ésta se puede hallar en situación de carencia extrema hacia el final de la fermentación. Un aporte excesivo de nitrógeno amoniacal puede, así mismo, provocar la aparición de compuestos azufrados nauseabundos, tales como el H_2S, responsable de olores desagradables (Ehsani *et al.*, 2001).

7.3 LEVADURAS

Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies (clasificadas a su vez en 39 géneros), lo que muestra que dentro de los hongos constituyen un pequeño grupo. Las levaduras son bastante heterogéneas en su morfología y fisiología; sin embargo, la forma habitual en que se les encuentra es la unicelular. Algunas, además de la forma unicelular o de levadura, pueden presentar micelio. Ambas formas, en estos casos, se dan simultáneamente en el medio donde se encuentra el microorganismo, independientemente de las condiciones ambientales.

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizada en el suelo, en la superficie de las frutas, en el néctar de las flores y en ambientes acuáticos. La mayoría son saprófitas y proliferan en materia orgánica muerta; otras son parásitas, facultativas u obligadas, por lo que se desarrollan en otros seres. Algunas levaduras que son parásitas pueden causar enfermedades en el hombre, animales y plantas. Entre las saprófitas, las fermentativas llevan a cabo la fermentación alcohólica de azúcares, característica que ha sido aprovechada por el hombre, desde tiempos remotos.

7.3.1 MORFOLOGÍA

Las células de las levaduras son relativamente grandes. Su tamaño varía entre 1-5 µm de ancho por 5 a 30 µm de largo, aunque la mayoría oscila entre 3 y 8 µm de diámetro.

Una levadura típica tiene forma ovoide pero también las hay alargadas, esféricas, de forma de pera o de limón o incluso triangulares. Cada especie tiene su forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existe cierta variación en el tamaño y la forma de las células, variación que puede depender de la edad de cultivo y del medio donde se encuentren.

La estructura de una levadura es la de una típica célula eucariótica. Al microscopio pueden observarse la pared celular, el citoplasma con vacuolas, glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos. Las levaduras no poseen flagelos ni otro órgano de locomoción. Algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula y que es semejante a la cápsula bacteriana.

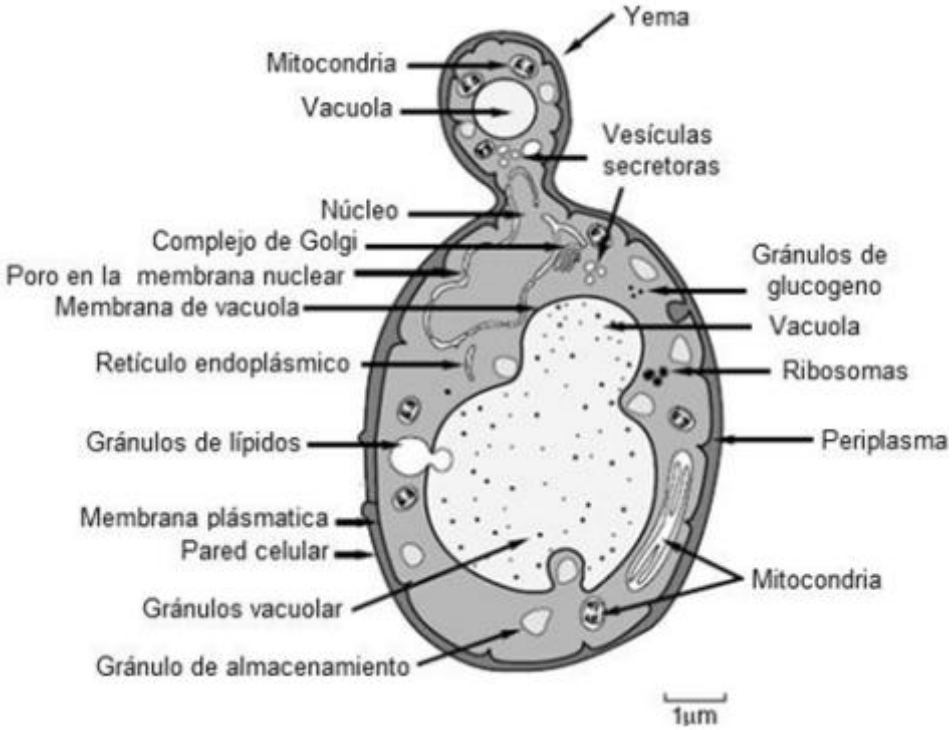


Figura 6. Diagrama de la estructura de una levadura

7.3.2 REPRODUCCIÓN

7.3.2.1 Asexual

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y unas pocas por fisión binaria.

En el proceso de gemación se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la cual se debe a un debilitamiento local de la pared celular. Esta pequeña protuberancia se agranda, al irse llenando de material citoplasmático proveniente de la célula madre, hasta alcanzar casi el tamaño de esta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula hija. Luego se forma la pared que divide las dos células y la célula hija se desprende de la madre (Figura 7).

La producción de las gemas puede ocurrir en uno o en ambos extremos de la célula, lo que se conoce como gemación polar, o puede producirse en lugares diferentes de la superficie celular, en cuyo caso se trata de la gemación multilateral o multipolar. En el lugar donde se formó una gema queda una cicatriz en la pared de la célulaa madre. En las levaduras polares, la producción de gemas se da siempre en el mismo lugar lo que contrasta con las levaduras multipolares en las cuales la gemación, generalmente, no ocurre de nuevo en el mismo lugar. Por esta razón, se puede considerar que en las levaduras polares, la gemación es infinita mientras que en las multipolares tiene un límite.

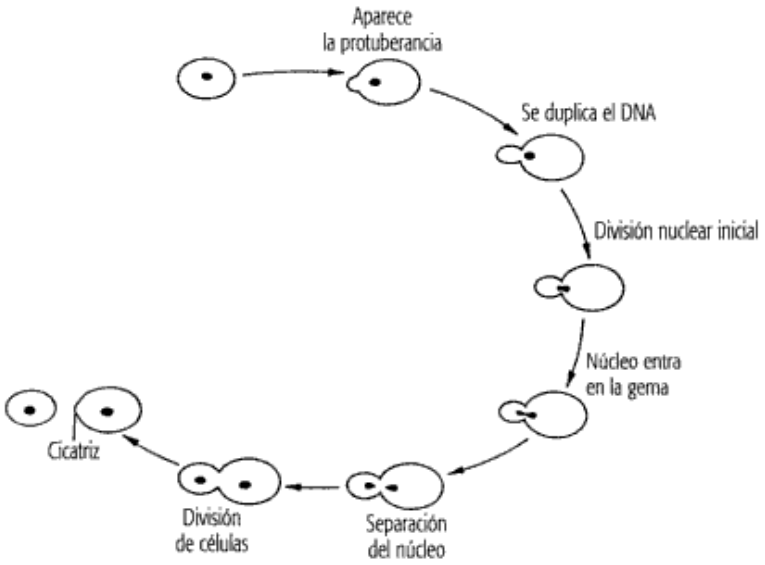


Figura 7. Esquema del proceso de gemación de las levaduras

En ocasiones, las células pueden permanecer unidas y formar nuevas gemas, y así sucesivamente; esto produce la formación de cadenas de levaduras conocidas con el nombre de pseudomicelio.

Figura 8. Pseudoicelio formado por una levadura

7.3.2.2 Sexual

La reproducción sexual de las levaduras se da por medio de la formación de esporas sexuales que pueden ser ascosporas o basidiosporas, dependiendo del tipo de célula especializada donde se formen (un asca o una basidia). Ambos tipos de esporas requieren que ocurra la unión de núcleos compatibles y una división meiótica.

La mayoría de las levaduras son ascosporas y una de las más estudiadas es la levadura que lleva a cabo la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

La reproducción sexual ocurre mediante la fusión de dos células vegetativas compatibles. Las células que se van a aparear se ponen en contacto, se disuelven sus paredes en el punto correspondiente y se produce la plasmogamia o fusión de plasmas. Posteriormente ocurre la cariogamia o unión de núcleos, lo cual origina una célula diploide (cigótica) que puede seguir reproduciéndose asexualmente por gemación (ciclo diploide), o puede entrar en un proceso meiótico, lo que da como resultado la formación de cuatro núcleos. Los núcleos se rodean de citoplasma y de pared propia; esto origina las ascosporas, que quedan contenidas en la vieja pared de la célula a la que se le llama, entonces, asca.

Una vez liberadas las ascosporas, estas germinan y se reproducen asexualmente produciendo el ciclo haploide. De acuerdo con las condiciones que se den en el medio, podría suceder que la mayor parte de la población pase por alguno de los dos ciclos, pero en la mayoría de los casos los dos ciclos se dan simultáneamente.

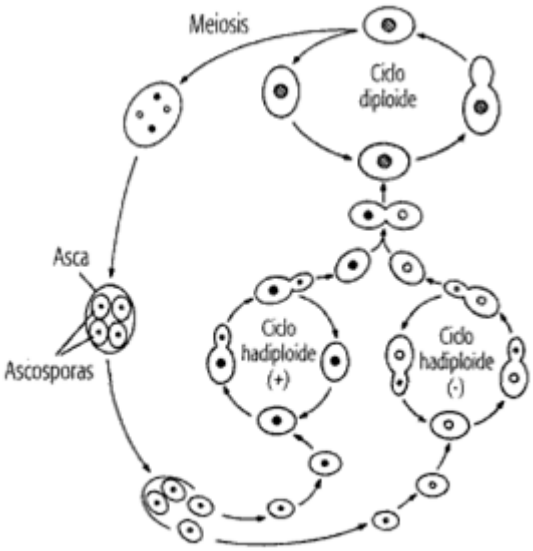


Figura 9. Esquema de ciclo de vida de una levadura ascosporada

7.3.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Una célula de levadura consiste de un 75% de agua y un 25% de macromoléculas (Salcedo, 2008).

- Carbohidratos 18-44%
- Proteínas 36-60%
- Ácido nucleico 4-8%
- Lípidos 4-7%
- Inorgánicos totales 6-10%
    - Fósforo 1-3%
    - Potasio 1-3%
    - Sulfato 0.4%
    - Vitaminas en cantidades traza

7.3.4 REQUERIMIENTOS NATURALES

Las levaduras son organismos heterótrofos, por lo tanto, requieren de carbono orgánico para obtener la energía y el carbono para la síntesis de sus componentes celulares. Sin embargo, los requerimientos nutricionales específicos de las levaduras pueden variar considerablemente entre las diferentes especies.

Los requerimientos de mayor interés para el hombre, puede ser los siguientes:

Los azúcares constituyen el mejor alimento energético de las levaduras. Muchas pueden, por ejemplo, catabolizar la glucosa, ya sea en forma aerobia

(respiración) o anaeróbica (fermentación). El proceso típico es la disimilación anaerobia, conocida comúnmente como fermentación alcohólica.

Bajo condiciones aerobias, las levaduras, al utilizar el oxígeno del aire, pueden oxidar la glucosa totalmente hasta dióxido de carbono y agua, o parcialmente, produciendo productos como ácidos orgánicos y otros productos intermediarios.

Las levaduras pueden obtener el nitrógeno que requieren para la síntesis de proteínas tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas y muchas especies pueden utilizar el ión amonio (NH_4^+). La capacidad para utilizar diferentes compuestos nitrogenados es una de las características que se usa para distinguir entre las diferentes especies.

El azufre puede ser suplido, a la mayoría de las levaduras, por sulfato (SO_4^{-2}) presente en el medio, pero algunas crecen mejor si está presente una fuente de azufre orgánico (aminoácidos azufrados como cisteína).

Las levaduras requieren, como otros seres, minerales para su crecimiento. Se ha determinado que el potasio, el magnesio, el sodio y el calcio se incluyen entre los necesario. En relación con los elementos traza, se ha demostrado que para obtener un rendimiento óptimo en medios de cultivo sintéticos se requiere la presencia de boro, cobre, zinc, manganeso, hierro, iodo y molibdeno.

La mayor parte de las levaduras crece mejor en medios en los que está disponible una buena cantidad de agua. Sin embargo, muchas de ellas pueden crecer en medios con relativamente poca cantidad de agua como en soluciones con una concentración elevada de solutos (sal o azúcar), por lo que puede decirse que en general requieren para su crecimiento de menos humedad que las bacterias. Sin embargo, en su inmensa mayoría, las levaduras no pueden desarrollarse bajo las extremas condiciones de sequedad en que lo hacen los mohos.

7.3.5 CONDICIONES AMBIENTALES REQUERIDAS PARA EL CRECIMIENTO

a) Oxígeno

Las levaduras crecen bajo condiciones aerobias. Algunas son estrictamente aerobias y otras facultativas.

Las facultativas crecen mejor en aerobiosis y bajo condiciones anaerobias lo hacen más lentamente. Las levaduras aerobias estrictas se conocen como

oxidativas; y las que pueden desarrollarse tanto en medios aerobios como anaerobios se denominan fermentativas.

b) pH

En general, se considera que las levaduras, al igual que los mohos, se desarrollan mejor en medios ácidos (3,8 – 5,6). Sin embargo, estas pueden tolerar un rango de pH va desde 2,0 hasta 8,0.

c) Temperatura

Existen levaduras que pueden crecer a muy diversas temperaturas, generalmente en un rango que va de 0 a 50°C. La mayoría de las especies saprófitas, sin embargo, tienen temperaturas óptimas de crecimiento entre los 22 y los 30°C.

d) Concentración de solutos

Las levaduras generalmente pueden desarrollarse en medios con concentraciones relativamente altas de solutos. Existe además, un grupo de levaduras que tolera cantidades de soluto aún mayores, por lo que se denominan osmófilas.

7.3.6 ESTUDIO DE LAS LEVADURAS EN EL LABORATORIO

a) Medios de cultivo

Las levaduras, al igual que los hongos, pueden crecer en los medios de cultivo que se utilizan para bacterias, pero igualmente se presentan problemas de contaminación si se parte de poblaciones mixtas. Por esta razón se usan medios con un pH bajo (4,5 – 5,5) para inhibir las bacterias. Los medios utilizados son semejantes a aquellos usados para el crecimiento de los hongos filamentosos. De uso universal como medios estándares para el crecimiento de las levaduras se encuentran los agares y caldos de extracto de malta o de extracto de levadura.

b) Condiciones de incubación

Los cultivos de levaduras se incuban generalmente a temperatura ambiente, ya que la mayoría son mesófilas. En relación con el oxígeno, las levaduras crecen mejor en condiciones aerobias y si bien es cierto que las facultativas (las que fermenta) pueden crecer también en anaerobiosis, lo hacen lentamente.

c) Métodos utilizados

Las levaduras crecen en los medios sólidos (con agar) formando colonias muy

semejantes a las de las bacterias.

7.3.7 FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LAS LEVADURAS

7.3.7.1 Osmotolerancia

En la fermentación alcohólica entre unos 100 o 200 g/L de azúcar no entorpecen a las levaduras, pero una tasa más elevada posee un efecto inhibidor que se suma al del alcohol y contribuye a detener prematuramente la fermentación (Tomasso, 2004).

Los mostos concentrados comerciales contienen una riqueza en azúcares situada entre 600 y 800 g/L, conservándose sin fermentar gracias a este fenómeno (Togores, 2011).

Cuando la concentración de azúcar inicial es elevada, la fase *lag* se prolonga, la viabilidad celular durante la fase *lag* disminuye y los recuentos de células viables durante la fermentación dan valores bajos. En síntesis, la fermentación se retarda y quedan elevados niveles de azúcar residual (Tomasso, 2004).

El estrés osmótico puede ser definido como cualquier situación en la que hay un desequilibrio de osmolaridades intracelulares y extracelulares, suficiente para causar un cambio perjudicial en la fisiología. En ambientes naturales, las levaduras están sometidas continuamente a cambios en la osmolaridad externa que puede ser extremadamente perjudicial para el funcionamiento celular (Gibson *et al.* 2007).

La inhibición por el azúcar se explica por un fenómeno de ósmosis: si una célula de levadura está situada en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas, las células serán plasmolizadas (Tomasso, 2004).

Las levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcar presentan una serie de propiedades fisiológicas que les permiten la adaptación y supervivencia en tales condiciones de A_w reducida. La fundamental es su capacidad de acumular en su interior alcoholes polihídricos (polioles) como arabitol, manitol, arabinitol o glicerol. Estos posibles polioles están implicados en la osmorregulación, y funcionan como solutos compatibles, es decir, sustancias que, acumuladas en niveles altos, protegen a las enzimas intracelulares frente a la inhibición e inactivación provocados por el estrés o el choque osmóticos. Al compensar la

diferencia de presión osmótica a ambos lados de la membrana, la capacidad metabólica de estas levaduras no es afectada (Casas, 1999).

Las levaduras osmotolerantes, sin embargo, son capaces de sintetizar y retener glicerol, incluso algunas poseen bombas para la captación activa de glicerol del medio. Esta concentración intracelular de glicerol parece estar regulada por la A_w externa mediante una ATPasa de membrana. La acumulación de este polialcohol puede ser afectada por el tipo de soluto que provoca el descenso de A_w (Casas, 1999).

Otros factores implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de soluto son la composición alterada de la pared y membrana celulares. Puesto que los polioles atraviesan con facilidad las membranas biológicas, en presencia de baja A_w deben existir variaciones estructurales y/o funcionales en las mismas que les confiera menor permeabilidad al glicerol. Un posible mecanismo es un cambio en la composición de los fosfolípidos de la membrana, concretamente del grado de instauración de los ácidos grasos, ya que a medida que aumenta este grado de insaturación aumenta también la fluidez de la membrana, y por tanto su permeabilidad. Por otra parte, la composición en esteroles también influye notablemente en la permeabilidad de la membrana, de manera que la incorporación de colesterol en las membranas las convierte en menos permeables a pequeñas moléculas orgánicas como son los polioles. Aquellos cambios en la composición de la membrana que disminuyan la fluidez y permeabilidad de la misma podrían por tanto facilitar la acumulación intracelular de polioles en los microorganismos osmotolerantes (Casas, 1999).

Restaino *et al.* (1983) sostienen que la A_w óptima para una levadura osmotolerante está fuertemente influida por el preacondicionamiento, es decir, la exposición previa y continua a elevadas concentraciones de azúcar. En este sentido, Tokuoka e Ishitani (1991) y Deak y Beuchat (1996) también afirman que la adaptación al entorno afecta a la osmotolerancia de las células de la levadura, pues tras la preincubación en presencia de elevadas concentraciones de un azúcar, las levaduras son capaces de crecer posteriormente en medios con menor A_w, es decir, con mayor concentración de este mismo azúcar. Por tanto, cabe de nuevo hacer mención a la especificidad de soluto, no solo en el preacondicionamiento, sino también en la supervivencia de las levaduras en medios con muy baja A_w. Así, Tokuoka e Ishitani (1991) encuentran que las células de levaduras de diferentes especies sobrevivirán incluso por debajo de la A_w mínima para el crecimiento cuando el medio contenía sacarosa, aunque

morían si tenía glucosa o fructosa; así mismo, la acción de la sacarosa disminuía la A_w mínima para el crecimiento tanto en cepas que asimilaban la sacarosa como en las que no (Casas, 1999).

7.3.7.2 Tolerancia a etanol

Hayashira y Ohta (1978) observaron que el crecimiento de las levaduras se suprimía completamente a una concentración de etanol de 12%, y que la toxicidad del etanol variaba con el tipo de microorganismo, así como dentro de las especies de un mismo género (Spencer y Spencer, 1990).

El etanol es tóxico para los microorganismos fermentadores, por lo tanto, solo en concentraciones limitadas de éste pueden ser acumuladas en el proceso de fermentación. Es conocido que el etanol ejerce efectos inhibitorios sobre los organismos, uno de ellos es la inhibición de la multiplicación celular y un efecto letal generalizado para las células.

La composición lipídica de la membrana sufre importantes modificaciones en respuesta a la adición de etanol en el medio de crecimiento, modificaciones que repercuten sobre las funciones de la membrana, en particular alterando los mecanismos de penetración de sustancias nutritivas, su permeabilidad selectiva y el mantenimiento de la vitalidad celular.

Entre los mecanismos de tolerancia a solventes orgánicos en los microorganismos encontramos:

Cambios en la membrana plasmática

Han sido estudiados varios mecanismos de respuesta a nivel de membrana para contrarrestar los efectos tóxicos debidos a la acumulación de solventes orgánicos. Estos cambios incluyen la modificación del grado de saturación de lípidos de la membrana, cambios en la composición de los lípidos, el recambio y la isomerización *cis-trans* de los lípidos insaturados, permitiéndole a la célula sobrevivir al daño inicial; sin embargo, no es el único mecanismo de tolerancia a los solventes. Los ácidos grasos no saturados de las levaduras son principalmente el ácido palmitoleico y el ácido oleico a los cuales se les ha atribuido un efecto protector de los efectos tóxicos del etanol. El ácido oleico es incorporado en la bicapa de fosfólipidos produciendo una disminución de la fluidez de la membrana, lo cual impide que el etanol ingrese a la célula. Esta relación entre la composición de lípidos y la tolerancia al etanol también fue

observada cuando se encontró la presencia del ergosterol, fosfatidilcolina y ácidos grasos de cadena larga lo que ocasionó en el microorganismo una mayor tolerancia al etanol (Salcedo, 2008).

Elevado contenido en esteroles (ergosterol) aumenta la rigidez y disminuye la permeabilidad de la membrana, favoreciendo la penetración de glucosa en la célula, sobre todo durante la fase estacionaria y de terminación de la fermentación alcohólica (Berreta, 2003).

El etanol inhibe el transporte de aminoácidos, maltosa y glucosa hacia el interior celular. La inhibición de estos procesos puede ser debida al cambio estructural de las proteínas enzimáticas. La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la disminución de la fluidez que produce el etanol como consecuencia de la sustitución de las moléculas de agua asociadas a los grupos polares, por dicho compuesto (Berreta, 2003).

Las altas concentraciones de etanol provocan un aumento del ingreso de protones a la célula. Dichos protones se excretan a través de una ATPasa de membrana, una bomba de iones hidrógeno que utiliza energía de la hidrólisis del ATP para bombear protones fuera de la célula (figura 10). El etanol actuaría también inhibiendo la ATPasa de membrana, por lo que se comenzarían a acumular protones en el citoplasma, dando como resultado la acidificación del medio interno. Las células de levaduras cultivadas en presencia de etanol tienen ATPasas más activas (Berreta, 2003).

Como consecuencia del aumento a la permeabilidad de los protones, la célula debe “apagar” sus sistemas transportadores acoplados a la entrada de protones (cotransporte), para evitar una “sobrecarga” en el funcionamiento de la ATPasa, influyendo por ejemplo en el ingreso de aminoácidos a la célula (figura 11), el cual se ve fuertemente inhibido en etapas tardías de la fermentación (Berreta, 2003).

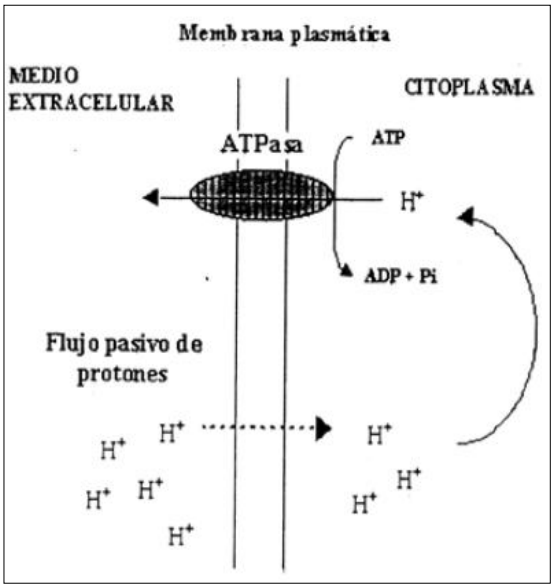


Figura 10. Actividad ATPasa en la membrana de las levaduras (Berreta, 2003)

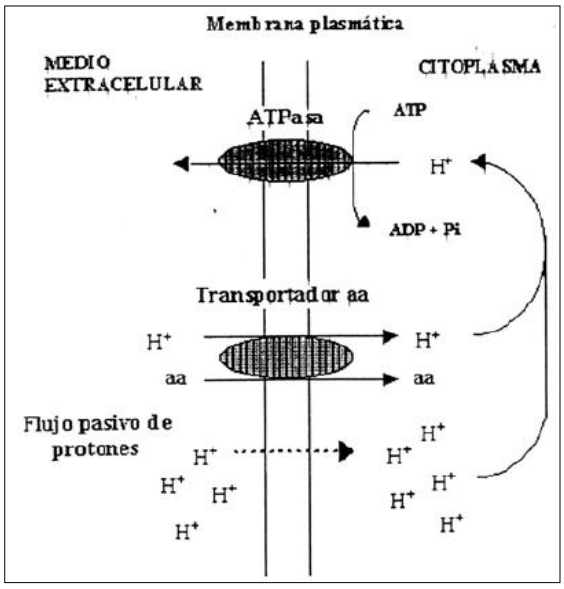


Figura 11. Efecto del etanol sobre el transporte de nutrientes (Berreta, 2003)

Producción de compuestos osmoprotectores

Entre estos se encuentran las biopelículas, las cuales son formadas por la agregación de microorganismos en estructuras multicelulares que se adhieren a las superficies. Además del aspecto estructural, las biopelículas son importantes porque promueven un cambio fisiológico en los microorganismos. En levaduras, después de la adhesión se inicia una adaptación en respuesta a esta nueva condición de crecimiento, la cual se refleja en la síntesis de polisacáridos y lipopolisacáridos, permitiéndole al microorganismo desarrollar una resistencia a varios compuestos orgánicos como el etanol. Aparentemente los lipopolisacáridos y polisacáridos interactúan físicamente con el etanol uniéndole y evitando que ingrese al interior de la célula, con lo que se genera la resistencia al etanol por parte de la biopelícula (Salcedo, 2008).

Sistema de respuesta a estrés oxidativo

El etanol causa dentro de la célula estrés oxidativo ya que al encontrarse en solución acuosa, se disocia formando especies reactivas de oxígeno. Uno de los mecanismos de defensa que presentan las levaduras es la acción de catalasas y peroxidasas, donde el etanol es oxidado a acetaldehído lo que llega a ocasionar un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno. A su vez, las peroxidasas convierten el peróxido de hidrógeno generando agua con lo cual ayuda a destoxificar a la célula (Salcedo, 2008).

Proteínas de respuesta a condiciones de estrés

La exposición de la célula al etanol es una causante de estrés lo cual puede desencadenar la síntesis de proteínas de respuesta a estrés. Entre ellas podemos mencionar a las chaperonas moleculares, las cuales participan en la protección de algunas enzimas que son desnaturalizadas por el efecto tóxico del etanol, permitiendo que éstas no sufran la pérdida de su función o desnaturalización, por lo que la protección otorgada por este tipo de proteínas permite la sobrevivencia del microorganismo (Salcedo, 2008).

7.3.8 AZÚCARES FERMENTABLES

El metabolismo de los carbohidratos dentro de la levadura puede realizarse por dos vías: una anaerobia a través de la glucólisis terminando con la síntesis de etanol, y otra aerobia, iniciando con la glucólisis pero culminando con el proceso de respiración en las mitocondrias; la ruta que siga dependerá por un lado de la concentración de oxígeno en el medio, aunque por otro es también dependiente de la concentración de azúcares en el medio (Asociación Mexicana de Microbiología, 1998).

Como materia prima para la fermentación alcohólica se utilizan generalmente mieles, jugos de frutas, etc., los cuales contienen glucosa y fructosa; igualmente es fácil de fermentar la sacarosa, no todos los azúcares pueden servir como sustrato para las levaduras. Tampoco puede fermentarse el almidón por cuanto las células de algunas levaduras, carecen de la enzima diastasa (amilasa) (Muller, 1964).

Una gran cantidad de microorganismos se reportan en la literatura para la producción de etanol a escala de laboratorio, pero muy pocos de estos tienen aplicación actualmente a nivel industrial. Cepas silvestres de diferentes microorganismos, por sus características bioquímicas, asimilan diferentes compuestos transformándolos en etanol, pero sus bajos rendimientos, su difícil propagación, la generación de subproductos, el estrecho abanico de sustratos asimilables, su baja tolerancia a distintas sustancias y condiciones, entre otras características, hacen que solo unas pocas tengan actual y exitosa aplicación a escala piloto o industrial (Mariscal, 2011).

Los microorganismos más utilizados son las levaduras, siendo diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las de mayor aplicación así como algunas bacterias, destacándose la *Zymomonas mobilis*. El cuadro 2 resume algunos de

los microorganismos utilizados y/o investigados para la producción de etanol a partir de diversos sustratos (Mariscal, 2011).

Cuadro 2. Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial (Mariscal, 2011)

Microorganismo	Sustratos fermentables	Condiciones de fermentación
Saccharomyces cerevisiae	Glucosa Fructosa Sacarosa Maltosa Maltotriosa Galactosa Manosa	Anaeróbico 30-37 °C
Schizosaccharomyces pombe	Glucosa Fructosa Maltosa Sacarosa	Anaeróbico 30-35 °C
Kluyveromyces marxianus	Glucosa Lactosa Fructosa	Anaeróbico 40-45 °C
Candida shehatae	Glucosa Xilosa	Microaerofílico 20-31 °C
Pichia stipitis	Glucosa Xilosa	Microaerofílico 26-35 °C
Pachisolen tannophilus	Glucosa Xilosa Glicerol	Microaerofílico
Zymomonas mobilis	Glucosa Fructosa Sacarosa	Anaeróbico 30 °C
Clostridium thermocellum	Glucosa Celulosa	Anaeróbico 55-65 °C
Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum	Glucosa Xilosa	Anaeróbico 60 °C
Candida guillermodii	Glucosa Sucrosa Galactosa Lactosa	
Candida albicans	Glucosa	

	Sucrosa Galactosa Maltosa
Candida kefir	Glucosa Sucrosa Galactosa Lactosa

7.3.9 FENOTIPO KILLER

Las cepas de levaduras killer fueron descubiertas por Bevan y Makower (1963) quienes demostraron que existen tres fenotipos: killer, neutro y sensible respecto al carácter killer. Las levaduras killer, se caracterizan por secretar una toxina que es letal para las cepas sensibles de su misma especie o especies de diferentes géneros, pero siendo ellas misma inmunes a sus propias toxinas. Las cepas neutras ni producen toxina ni son sensibles a la toxina killer.

Las levaduras killer con buenas características de fermentación han sido seleccionadas para la fermentación de la cerveza, vino o sake, y por lo tanto, pueden usarse como cultivos iniciadores en la industria del vino y así prevenir contaminaciones por cepas de levaduras salvajes sensibles (Rodríguez y Abad, 1998).

En el género *Sacchromyces,* el mecanismo bioquímico de la actividad killer está asociado a la presencia de dos tipos de partículas víricas intracelulares VLP (virus-like particle). Estas VLP están formadas por dos cadenas de ARN de doble hélice, L y M (esta última codifica la toxina y un factor inmune de autoresistencia a la toxina). Además, toda una serie de genes nucleares (más de 30) (Rodríguez y Abad, 1998).

Las cepas killer secretan una toxina proteica que se fija sobre receptores glucídicos de la pared celular de la cepa killer- sensible interfiriendo en el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática, lo que implica la muerte celular. En el género *Saccharomyces* se han encontrado al menos tres grupos de actividad (K1, K2 y K3) y cinco de resistencia. Sin embargo, los grupos más estudiados son el K1 y K2. El pH óptimo para la producción de la toxina K1 se encuentra entre 4.6 y 4.8, por encima del pH del vino, lo que implica su escaso interés en la selección de levaduras vínicas. Por el contrario, el rango de pH para el grupo de actividad K2 coincide con el del vino entre 2.9 y 4.9.La

toxina killer K2 es estable en las diferentes condiciones presentes en el vino (pH, temperatura de fermentación, etanol, SO_2, compuestos fenólicos, etc.). Sin embargo, la adición de bentonita durante la fermentación alcohólica puede suprimir toda actividad killer (Rodríguez y Abad, 1998).

La actividad killer puede representar uno de los mecanismos de antagonismo de levaduras durante la fermentación espontánea. En las poblaciones de *Saccharomyces* salvajes puede existir un número relativamente elevado de cepas killer-resistentes a la toxina, lo que reduciría el interés de las cepas killer. Por otra parte, las poblaciones killer salvaje presentes en los mostos de una bodega o un área determinada pueden malograr la siembra de una cepa killer-sensible seleccionada por sus mejores características enológicas. Sin embargo, generalmente, para la selección de las levaduras vínicas se debe atender a cepas con el fenotipo killer, ya que favorecen la eliminación de la población indígena (Rodríguez y Abad, 1998).

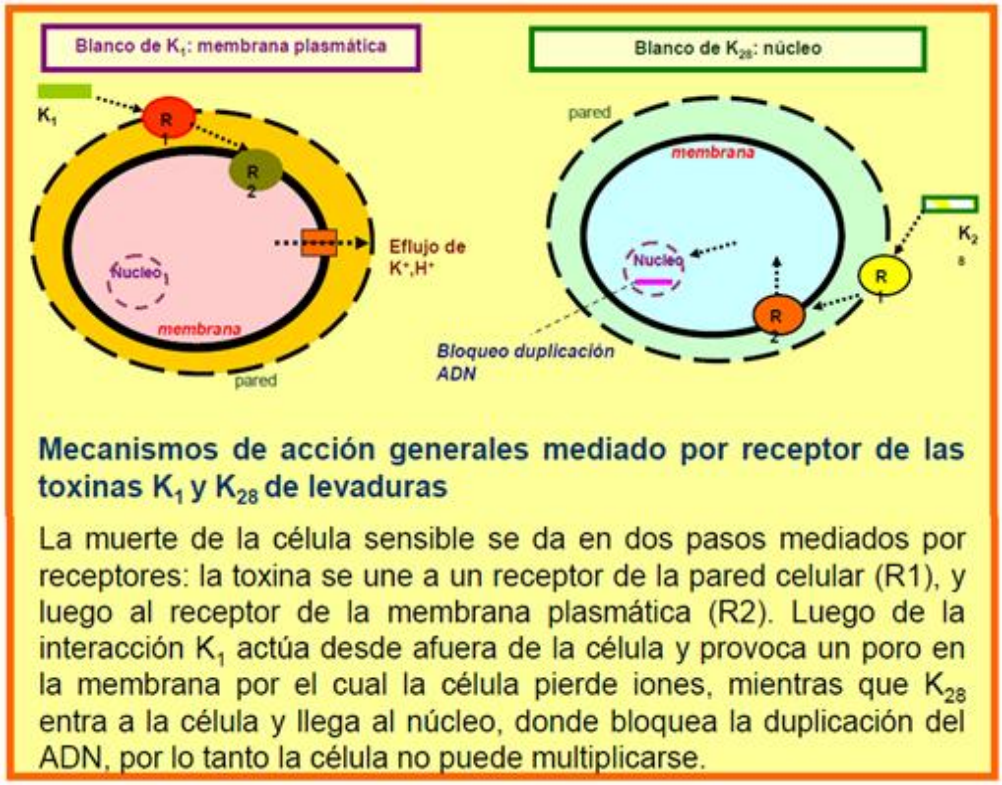


Figura 12. Mecanismo de acción de las toxinas killer (Rivero *et al.*, 2006)

7.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L. Y MIEL DE PANELA

El aguamiel es un exudado que se obtiene de la planta de maguey, es un producto de aspecto líquido, de sabor dulce agradable, de olor característico,

con colores que varían de blanco tenue a amarillo claro. La cantidad de aguamiel que se puede extraer de cada planta varía de acuerdo al tamaño de la planta, de su madurez óptima y de la estación del año. La composición del aguamiel se muestra en el cuadro 3 (Bautista, 2006).

Cuadro 3. Composición Químico Bromatológico de aguamiel en muestra fresca y seca

DESCRIPCIÓN	Muestra fresca (g%)	Muestra seca (g%)
Humedad	87.38	--
Densidad	1.0226	--
PH	7.72	--
Proteínas	0.30	2.38
Grasas	0.01	0.08
Carbohidratos	12.03	95.32
Cenizas	0.23	1.82
Fibra cruda	0.05	0.40
Acidez titulable	0.03	0.24
A.R.D. (g/% glucosa)*	0.97	7.69
A.R.T. (g/% glucosa)*	9.08	71.95
Energía total (Kcal/100g de muestra)	37.28	335

La panela se obtiene de la concentración del jugo de caña sin un proceso tecnológico ni asepsia rigurosa. Desde el punto de vista técnico se puede definir como "hidrato de carbono, edulcorante moldeado, nutritivo por sus minerales y vitaminas, de color café, sabor dulce, soluble en agua (rápida solubilidad en agua caliente), aroma característico, utilizada en la industria como edulcorante" (Cascante, 2004).

En la composición química de la panela influyen factores como variedad de caña, tipo de suelo, temperaturas, luminosidad, tiempo, sistema de corte, almacenamiento y las condiciones de cada etapa del proceso (Cascante, 2004).

La composición química de la panela en cuanto a contenido de azúcares, minerales, vitaminas, entre otros, se indica en el cuadro 4 (Cascante, 2004).

Cuadro 4. Composición química por cada 100 gramos de panela

Carbohidratos	mg.	Vitaminas	mg.
Sacarosa	72 a 78	Provitamina	2.00
Fructosa	1.5 a 7	Vitamina A	3.80
Glucosa	1.5 a 7	Vitamina B1	0.01
Minerales	mg	Vitamina B2	0.06
Calcio	40 a 100	Vitamina B5	0.01
Magnesio	70 a 90	Vitamina B6	0.01
Fósforo	20 a 90	Vitamina C	7.00
Sodio	19 a 30	Vitamina D2	6.50
Hierro	10 a 13	Vitamina E	111.30
Manganeso	0.2 a 0.5	Vitamina PP	7.00
Zinc	0.2 a 0.4	Proteínas	280
Fluor	5.3 a 6.0	Agua	1.5 a 7.0 g
Cobre	0.1 a 0.9	Calorías	312

7.5 DESTILACIÓN ALCHÓLICA

Terminada la fermentación, el mosto muerto (muerte celular) se destila con un equipo de destilación o en los alambiques de acero inoxidable o cobre. El producto de la destilación es el vapor que ha sido condensado el cual es rico en alcoholes (Jurado y Sarzosa, 2009).

En la destilación para licores generalmente se realiza una primera destilación en la que se obtiene un producto de graduación alcohólica de 20% v/v, es decir que la destilación continúa hasta que el producto haya llegado normalmente a 20 grados alcohólicos. A este producto se le denomina Ordinario. El producto destilado está compuesto por una serie de compuestos alcohólicos e impurezas volátiles, los cuales son separados en una segunda destilación con

fraccionamiento térmico. Las temperaturas de fraccionamiento corresponden a las temperaturas de ebullición de las sustancias que componen el ordinario, siendo el más abundante el etanol (Jurado y Sarzosa, 2009).

Los productos de la segunda destilación pueden ser agrupados como: alcoholes de cabeza, de corazón y de cola. Los alcoholes de cabeza son aquellos de bajo punto de ebullición y están formados por ésteres y aldehídos de mayor volatilidad; los de corazón tienen un punto de ebullición intermedio entre el de cabeza y el de cola, constituidos principalmente por etanol; los de cola corresponden a los alcoholes superiores (Jurado y Sarzosa, 2009).

7.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para la determinación del contenido de etanol en una muestra, la mayoría de las técnicas empleadas requieren la destilación de la misma, con la finalidad de eliminar componentes que puedan interferir en el análisis. Sin embargo, la cromatografía de gases (GC), reduce la importancia de este aspecto, debido a que las condiciones de operación del equipo permiten la separación de los componentes de la mezcla, permitiendo identificar y cuantificar el etanol sin la presencia de otros compuestos. Además, tiene la gran ventaja de requerir volúmenes de muestra muy pequeños (de 1 a 5 µL), lo que permite realizar análisis a pequeña escala (Ortiz, 2006).

Como descripción general, la muestra en estado gaseoso se desplaza con ayuda de un gas inerte (denominado fase móvil) a través de una columna en cuyo interior se halla un agente denominado fase estacionaria. Al pasar por la columna, existe una retención por parte de la fase estacionaria hacia los componentes de la muestra, variando en mayor o menor grado, dependiendo de la afinidad de cada uno de los componentes hacia la fase. Así al crearse una distribución desigual de componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria, los componentes que sean más fuertemente retenidos por la fase estacionaria se desplazarán de manera más lenta a través de la columna que aquellos cuya retención sea menor. Como consecuencia de este fenómeno se efectúa la separación, representada por la formación de picos (conocidos como cromatogramas), los cuales pueden analizarse tanto de manera cualitativa como cuantitativa (Ortiz, 2006).

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L.

8.1.1 TOMA DE MUESTRA

La recolección del aguamiel se hizo en la primavera del año 2012, en plantas de agave localizadas en Las Rosas, Chiapas, con una edad de 8 años, lo cual marca su madurez. Primeramente se llevó a cabo una incisión en el corazón de la piña, en donde la planta secretó savia, la cual es conocida como "aguamiel", dicha incisión fue cubierta con plástico para evitar la presencia de insectos. La colecta de agua miel se llevó a cabo con cucharones limpios, colocándolo en un termo.

8.1.2 TRANSPORTE

El termo conteniendo aguamiel, fue colocado en una hielera de unicel a una temperatura aproximada de 12-15°C, para ser transportada y analizada en el laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

8.1.3 CULTIVO ENRIQUECIDO

Se preparó caldo de cultivo YM (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona de caseína 5 g/L y glucosa 10 g/L) a pH 4.7 con oxitetraciclina (4 g/L). Fueron depositados 50 ml del caldo en 6 matraces Erlenmeyer de 250 ml y esterilizados a 121°C por 15 min, cada matraz se inoculó con 5 ml de aguamiel (10% de inóculo) y un matraz control. Tres matraces se mantuvieron a temperatura ambiente y los otros tres a temperatura constante de 30°C, todos los matraces estuvieron sin agitación y con su respectivo control por un tiempo de incubación de 8 horas.

8.1.4 RESIEMBRA

Concluidas las 8 horas, se tomaron 5 mL de los matraces anteriores para reinocular en matraces con 50 mL de caldo YM con oxitetraciclina (4 g/L), a pH 4.7. Tres de los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente y tres a temperatura constante de 30°C, cada uno con su respectivo control, sin agitación y con un tiempo de incubación de 17 horas.

8.1.5 AISLAMIENTO

Transcurridas las 17 horas se tomaron asadas de cada matraz y se sembró en cajas con agar YM pH 4.7 y antibiótico (oxitetraciclina 4 g/L) por estría cruzada. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y a 30°C durante 48 horas, con el fin de distinguir colonias características de levaduras.

8.1.6 SELECCIÓN DE COLONIAS

Las colonias aisladas con apariencia lisa, brillosas, redondas, cremosas y contorno definido, fueron resembradas por estría cruzada en agar YM pH 4.7 con antibiótico (oxitetraciclina 4 g/L), cada resiembra se realizó por triplicado. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 72 horas.

8.1.7 CULTIVO EN MEDIO SELECTIVO (WL)

Se cultivaron las diferentes colonias encontradas en el medio YM, en medio WL (glucosa 50 g/L, fosfato monopotásico 0.55 g/L, peptona de caseína 5 g/L, cloruro de calcio dihidratado 0.125 g/L, extracto de levadura 4 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 0.125 g/L, cloruro de potasio 0.425 g/L, cloruro férrico hexahidratado 2.5 mg/L, sulfato de manganeso tetrahidratado 2.5 mg/L, verde de bromocresol 22 mg/L y agar bacteriológico 20 g/L) a pH 4.7 con antibiótico (cloranfenicol 0.1 g/L), con el fin de poder identificar cada una de las diferentes levaduras según su morfología colonial.

8.1.8 RESIEMBRA EN TUBO

Con la finalidad de conservar a las levaduras aisladas, se inocularon 15 tubos inclinados con agar YM y antibiótico (oxitetraciclina 4 g/L) por cada una de las diferentes cepas provenientes de las cajas de YM en las cuales ya se habían aislado.

8.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS AISLADAS

8.2.1 PRUEBA DE AZÚCARES FERMENTABLES

Se prepararon tubos con 8 ml de medio de cultivo, 0.25% p/v de extracto de levadura y 0.75% p/v de peptona de caseína. Cada tubo fue previsto de una campana Durham para la observación de gas. Por separado se prepararon soluciones al 10% p/v de los siguientes azúcares: Fructosa, Glucosa, Lactosa, Sacarosa y Manitol. Los tubos fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Las soluciones de azúcares fueron esterilizadas por filtración, utilizando

membranas.

Posteriormente a cada tubo se le añadió 2 mL de la solución de azúcar, haciendo duplicados de cada uno de ellos. Seguido de esto los tubos fueron inoculados por asada de cada levadura a analizar y se incubaron por 120 horas a 30°C, observando el proceso cada 24 horas.

8.2.2 EFECTO KILLER

Se determinó el fenotipo killer de las cepas aisladas empleando para ello placas con medio YEPD (Extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L, agar 20 g/L, glucosa 20 g/L y azul de metileno 0.03 g/L) con un pH de 4.5. Para una mejor absorción del inóculo en el medio, se dejaron deshidratar las placas durante 4 días y después de esto cada una de las cajas se inoculó con 0.1 mL del inóculo respectivo. La siembra se realizó en forma de césped utilizando perlas de ebullición (previamente esterilizadas a 121°C por 15 minutos) y la otra cepa se sembró en forma puntiforme o rectilínea con ayuda de un asa, para obtener así un enfrentamiento de dos cepas diferentes, hasta enfrentarlas todas. Las placas se incubaron a 22°C durante una semana. Al cabo de este tiempo, se procedió a la observación de los diferentes fenotipos: i) las colonias sembradas en forma rectilínea rodeadas de un halo azul oscuro sobre césped se consideraron fenotipo killer, ii) las colonias que se sembraron en forma de césped y su crecimiento fue inhibido por ese halo se consideraron killer-sensible y iii) las colonias que se sembraron en forma de césped que no se vieron afectadas por el halo de inhibición sino que por el contrario tanto esta como la otra cepa en estudio crecieron en armonía, se consideraron fenotipo neutro (Rodríguez y Abad, 1998).

8.2.3 PRUEBA DE OSMOTOLERANCIA

Las cepas de levaduras fueron sometidas a una prueba de osmotolerancia, evaluando concentraciones de glucosa de 200, 250, 300 y 350 g/L, para ello se empleó caldo YM (Extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L y peptona de caseína 5 g/L). Se prepararon matraces por duplicado por cada concentración con un volumen de 80 mL de medio y 10% v/v de inóculo. Se mantuvieron en agitación durante 48 horas a 120 rpm y se tomaron muestras cada 3 horas para determinar el crecimiento celular mediante la medición de densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm.

8.2.4 PRUEBA DE TOLERANCIA A ETANOL

Las cepas de levaduras fueron sometidas a una prueba de tolerancia al etanol, evaluando concentraciones de 5, 10 y 15% v/v, para ello se empleó caldo YM (Extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona de caseína 5 g/L y glucosa 10 g/L). Se prepararon matraces por duplicado por cada concentración con un volumen de 80 ml de medio y 10% v/v de inóculo. Se mantuvieron en agitación durante 48 horas a 120 rpm y se tomaron muestras cada 3 horas para determinar el crecimiento celular mediante la medición de densidad óptica a una longitud de onda de 540 nm.

8.2.5 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL (MÉTODO DE OXIDACIÓN DEL DICROMATO)

Se prepararon matraces con 150 ml de medio sintético (glucosa 100 g/L, extracto de levadura 3g/L, sulfato de amonio 4g/L, fosfato de potasio dibásico 1.5 g/L y sulfato de magnesio heptahidratado 0.55 g/L) previamente esterilizados a 121°C por 15 min, los cuales fueron inoculados con 15 mL de una suspensión microbiana de la cepa respectiva. Los matraces fueron puestos en agitación a 75 rpm por 48 h.
Para asegurar que la suspensión de levadura empleada como inóculo fuera homogénea en todos los matraces; previamente cada cepa se hizo crecer en matraces con 100 ml de medio YM a una agitación de 120 rpm durante 8 h.

Se tomaron muestras cada 3 h y estas se centrifugaron a 10 000 rpm a 25 °C por 5 minutos para la cuantificación de etanol mediante el método del dicromato, para ello se colocaron en un tubo eppendorf un mL del sobrenadante y un ml de fosfato de tributilo agitándolo en el vórtex durante una hora, transcurrido el tiempo se observa una fase de separación, se tomaron 750 µL de la fase solvente (fase superior) y transfiriéndolo a un nuevo tubo eppendorf, adicionándole 750 µL de dicromato de potasio (10 g de dicromato de potasio disueltos en 100 mL de ácido sulfúrico 5 M), agitándolo nuevamente en el vórtex durante media hora. Después de este tiempo se aprecia otra fase de separación, se tomaron 500 µL de la fase inferior para llevarlo a un volumen final de 3.5 mL con agua destilada, leyendo la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm (Hyun *et al.*, 2008).

8.3 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA FERMENTACIÓN EMPLEANDO MIELES DE AGAVE Y PANELA

8.3.1 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Para asegurar la biomasa necesaria para iniciar el proceso de semilleo se utilizaron cepas con 48 horas de crecimiento en agar inclinado. Se realizó una suspensión densa agregando 10 mL de agua estéril en 5 tubos con cultivo. Esta suspensión fue inoculada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 120 mL de medio YM, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos; el matraz se mantuvo en agitación a 100 rpm por 8 horas a una temperatura de 30°C. Concluidas las 8 horas, el cultivo se dejó sedimentar durante 10 minutos, se realizó un conteo al microscopio en cámara de Neubauer para asegurar una biomasa de 1 x 10^8 células/mL, y se tomó 25 mL del sedimento para iniciar la etapa de semilleo.

8.3.2 SEMILLEO

Durante el semilleo se pretende incrementar la concentración celular, adaptando a la levadura al mosto de fermentación. Para ello se alimentó al inóculo con miel de agave y miel de panela, ambas a 12° Brix, a diferentes proporciones (60:40, 65:35 y 70:30) y sulfato de amonio, a través de un sistema de lote alimentado hasta alcanzar un volumen final de 5 litros, como se observa en el anexo 11.2.

8.3.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La miel de agave almacenada a 75° Brix fue diluida con agua destilada hasta una concentración de 22° Brix. Para la miel de panela, se cortaron trozos de panela para mezclarlo con agua destilada hasta alcanzar una solución de 22° Brix. Se evaluaron diferentes proporciones de miel de agave y miel de panela (60:40, 65:35 y 70:30), agregando 3.3 g/L de sulfato de amonio. La fermentación se realizó en envases de plástico con capacidad de 5 L, conteniendo 1.5 litros de mosto de fermentación (miel de agave: miel de panela) tapándolos con tela poliéster para evitar contaminación por insectos. El mosto de 1.5 litros fue inoculado con 1.5 litros de inóculo proveniente del semilleo con una biomasa de 2 x 108 células/ml. El proceso fermentativo se realizó en forma anaerobia durante tres días y a temperatura ambiente.

El monitoreo de la fermentación se realizó en tres tiempos: 24, 48 y 72 horas,

recolectando 1 litro de muestra por triplicado para cada tratamiento, los cuales fueron almacenados a -5°C hasta su análisis.

8.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO EL DENSÍMETRO

Las muestras de los caldos de fermentación fueron destiladas a una temperatura entre 78°C y 85°C, empleando equipo Corning. Los destilados obtenidos fueron analizados en un densímetro (Anton Paar DMA 4500 M) para evaluar su contenido de etanol.

8.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES

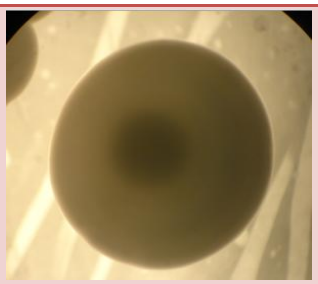
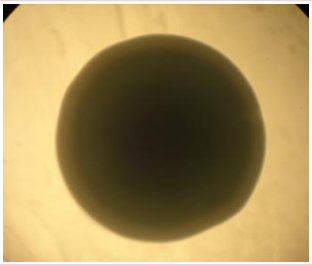
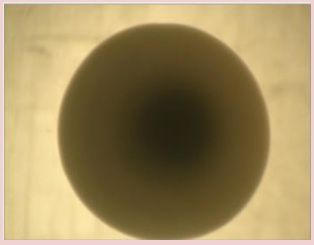
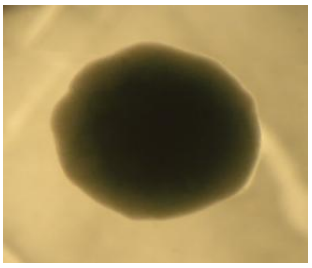
Los destilados de cada tratamiento fueron deshidratados con sulfato de sodio y se determinaron sus compuestos volátiles en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas en modo splitless empleando una columna DB-Wax con una temperatura de 40°C por 3 minutos, incrementando 3°C por min hasta 120°C y después 6°C por minuto hasta 200°C y manteniendo por 60 minutos, se utilizó helio como gas acarreador con un flujo de 1 min por minuto. La temperatura del inyector y detector fue de 180 y 230°C, respectivamente. El potencial de ionización del Espectrómetro de Masas fue de 70 eV y la temperatura de línea de transferencia fue de 230°C. Los análisis se hicieron por triplicado (De León *et al*., 2006).

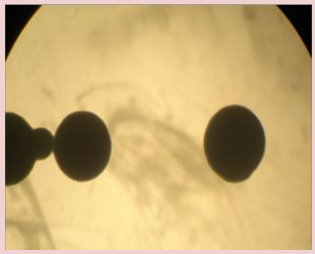
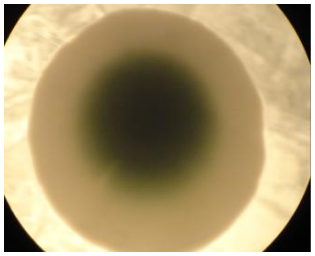
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 AISLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS DEL AGUAMIEL DE *Agave americana* L.

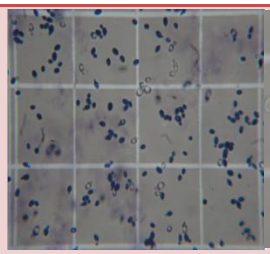
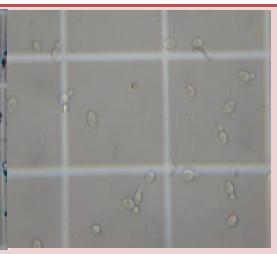
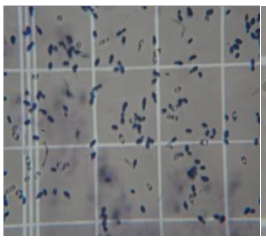
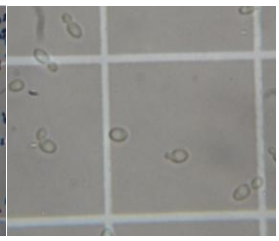
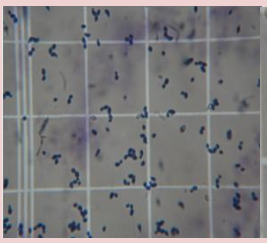
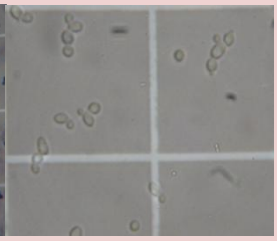
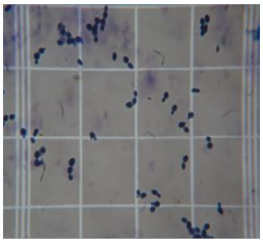
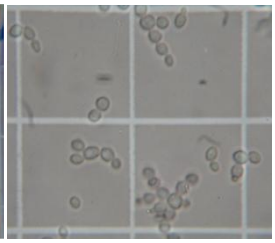
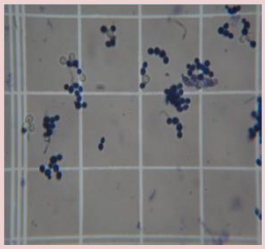
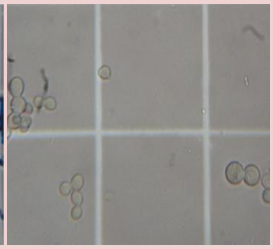
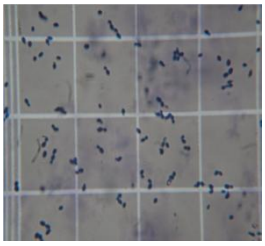
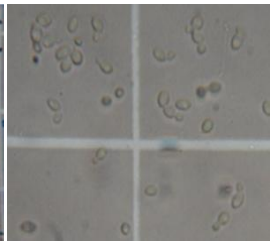
A partir del aguamiel de *Agave americana* L. se lograron aislar 6 cepas de levadura, las cuales presentaron diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas que se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Identificación morfológica en el estereoscopio de las cepas aisladas en medio WL

Cepa		Morfología macroscópica
CAS-*Aa*L01		**Circulares, con borde entero, cremosas, convexas, opacas, grandes, blancas con centro verde, rodeadas de un halo verde.**
CAS-*Aa*L02		**Circulares, con borde ondeado, lisas, acuminadas, opacas, grandes, verdes oscuro rodeadas por halos de color verde tenue y por un halo blanco.**
CAS-*Aa*L03		**Circulares, con borde entero, lisas, convexas, grandes, color crema con centro verde rodeado de un halo verde claro.**
CAS-*Aa*L04		**Irregulares, borde ondulado, convexas, medianas, opacas, color verde con halo color crema,**

CAS-*Aa*L05		**Circulares, con borde entero, medianas, convexas, opacas, color verde oscuro.**
CAS-*Aa*L06		**Circulares, con borde entero, grandes, elevadas, cremosas, opacas, color verde oscuro con contorno pronunciado color blanco.**

Cuadro 6. Identificación morfológica en el microscopio de las cepas aisladas en medio WL

Cepa	(10X) con azul de metileno	(10X) sin azul de metileno	Morfología microscópica
CAS-*Aa*L01			**Ovaladas, borde definido, células medianas, se reproducen por gemación.**
CAS-*Aa*L02			**Ligeramente ovaladas, borde definido, células medianas, se reproducen por gemación. Parte oscura en los extremos.**
CAS-*Aa*L03			**Ovoides, borde definido, células medianas, se reproducen por gemación.**
CAS-*Aa*L04			**Circulares-ovoides, borde definido, células grandes, se reproducen por bipartición.**
CAS-*Aa*L05			**Circulares, borde definido, células grandes, se reproducen por bipartición.**
CAS-*Aa*L06			**Ovaladas, borde definido, células pequeñas, se reproducen por gemación.**

Un factor importante para la recolección del aguamiel es la edad fenológica de la planta, la cual debe cortarse cuando haya alcanzado la madurez necesaria para ofrecer una alta concentración de azúcares en la piña. La cantidad de carbohidratos, principalmente azúcares reductores, presentes en la piña, es de vital importancia, ya que ellos son los que van a fermentarse para obtener el etanol (Bautista *et al*., 2001).

Las especies de levaduras involucradas en la fermentación de mostos de agave son variables, las cuales difieren en su forma, tamaño, elevación, consistencia, color y reproducción, siendo estos los criterios evaluados para clasificarlas.

Se evaluó el crecimiento de las cepas aisladas a temperatura ambiente y a 30°C, observándose un mayor crecimiento de estas a temperatura ambiente, pues la temperatura más adecuada para la reproducción de las levaduras oscila entre 22°C a 27°C y se reproducen con mayor rapidez cuando la temperatura es de 25°C.

9.2 PRUEBA DE AZÚCARES FERMENTABLES

Esta prueba permitió evaluar la capacidad fermentativa de cada una de las cepas aisladas (Cuadro 7), empleando para ello cinco diferentes azúcares, en base a la producción de gas, turbidez y crecimiento de biomasa.

Cuadro 7. Fermentación de azúcares de las levaduras aisladas del aguamiel

Cepas	Azúcares		Día 4
CAS-*Aa*L01	Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Lactosa	Gas	+++
		Turbidez	++
		Biomasa	++
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	-
		Biomasa	-
	Sacarosa	Gas	+++
		Turbidez	+
		Biomasa	++
CAS-*Aa*L02	Fructosa	Gas	+++

		Turbidez	+++
		Biomasa	++
	Glucosa	Gas	+++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++
	Lactosa	Gas	-
		Turbidez	++
		Biomasa	+
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	+
		Biomasa	+
	Sacarosa	Gas	+++
		Turbidez	++
		Biomasa	+
CAS-*Aa*L03	Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Lactosa	Gas	+++
		Turbidez	+
		Biomasa	+++
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	-
		Biomasa	+
	Sacarosa	Gas	+++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++++
CAS-*Aa*L04	Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	++++
		Biomasa	+++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++++
	Lactosa	Gas	-
		Turbidez	-
		Biomasa	+
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	-
		Biomasa	-
	Sacarosa	Gas	+
		Turbidez	-
		Biomasa	++

CAS-*Aa*L05	Fructosa	Gas	+++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++++
	Lactosa	Gas	-
		Turbidez	+
		Biomasa	+
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	+
		Biomasa	+
	Sacarosa	Gas	+++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	++
CAS-*Aa*L06	Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	+++++
		Biomasa	++++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++++
		Biomasa	++++
	Lactosa	Gas	+
		Turbidez	+
		Biomasa	++
	Manitol	Gas	-
		Turbidez	-
		Biomasa	-
	Sacarosa	Gas	+
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
A1	Fructosa	Gas	+++
		Turbidez	++
		Biomasa	++
	Glucosa	Gas	+++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Lactosa	Gas	+
		Turbidez	+
		Biomasa	+
	Manitol	Gas	+
		Turbidez	+
		Biomasa	++
	Sacarosa	Gas	++++
		Turbidez	+++

		Biomasa	+++
A3	Fructosa	Gas	++++
		Turbidez	++++
		Biomasa	+++
	Glucosa	Gas	++++
		Turbidez	+++
		Biomasa	+++
	Lactosa	Gas	+++
		Turbidez	++
		Biomasa	+
	Manitol	Gas	++
		Turbidez	+
		Biomasa	+
	Sacarosa	Gas	-
		Turbidez	+
		Biomasa	+

Acotaciones: - nada, +mínimo, ++escaso, +++poco, ++++bastante, +++++abundante

El aguamiel del Agave es un fluido rico en carbohidratos como la fructosa, sacarosa y glucosa, por ello fue importante evaluar la capacidad de fermentación de carbohidratos de cada una de las cepas aisladas.

La prueba se realizó con cinco carbohidratos diferentes, de los cuales la glucosa resultó ser el azúcar fermentable por todas las cepas aisladas, obteniendo los mismos resultados para fructosa. A diferencia de los resultados anteriores tres cepas no fermentaron sacarosa, las cuales fueron CAS-*Aa*L04, CAS-*Aa*L06 y A3, esto podría deberse a que las células de estas levaduras no poseen la enzima invertasa (sacarasa), que actúa como catalizadores para la hidrólisis de este disacárido.

En cuanto a lactosa resultaron positivas las cepas de levadura CAS-*Aa*L01, CAS-*Aa*L03 y A3. En el cuadro 2 se observan algunos de los microorganismos que fermentan lactosa, los cuales son *Kluyveromyces marxianu, Candida guillermodii* y *Candida kefir*.

9.3 EFECTO KILLER

Se llevó a cabo una caracterización fenotípica de la actividad killer de las cepas aisladas del aguamiel, de las cuales cuatro de ellas presentaron fenotipo killer CAS-*Aa*L02, CAS-*Aa*L06, A1 y A3, un fenotipo neutro CAS-*Aa*L01 y dos fenotipos sensibles CAS-*Aa*L04 y CAS-*Aa*L05 (Figura 13).

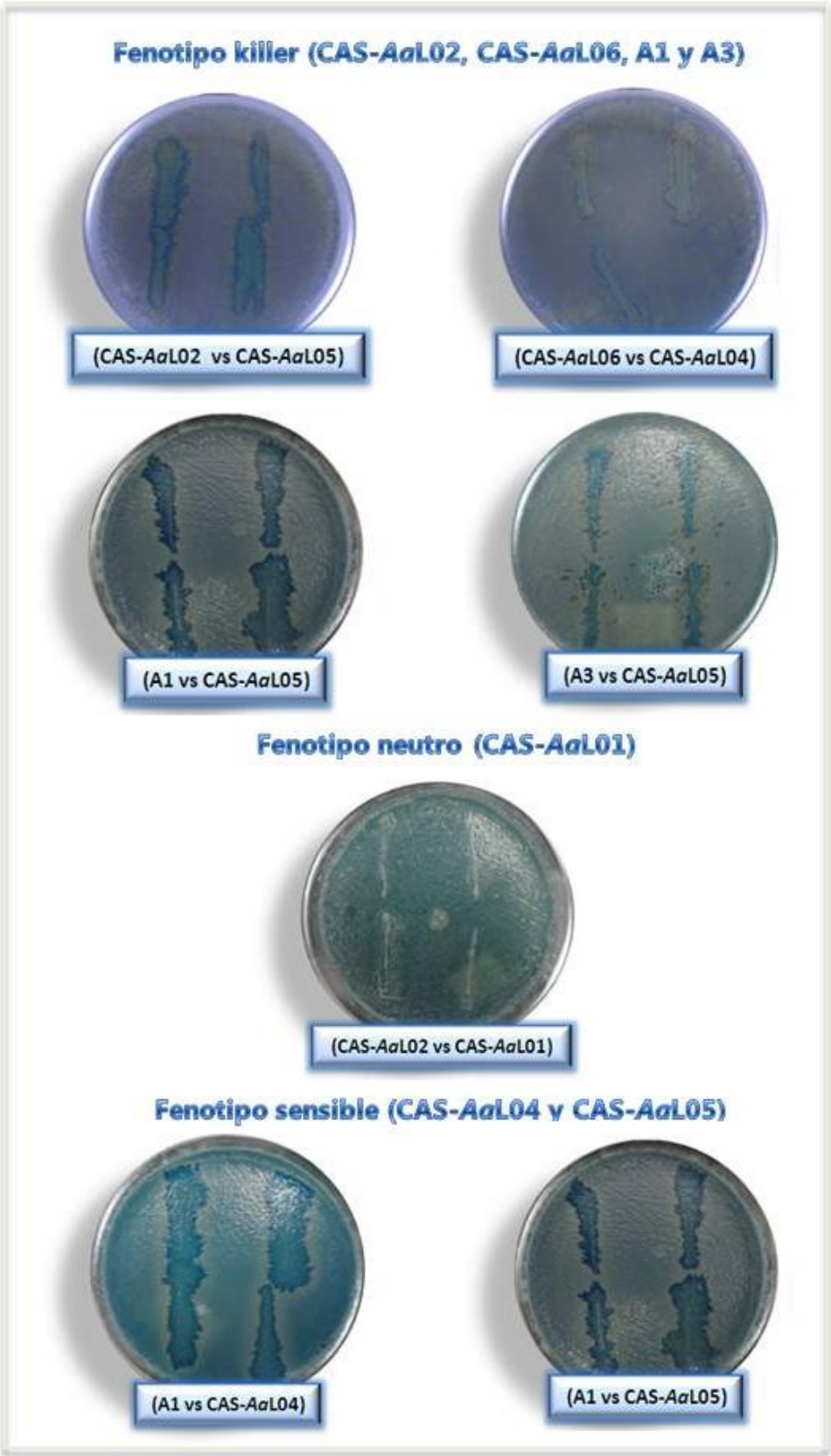


Figura 13. Fenotipo killer, killer-sensible y neutro que presentaron las cepas de levadura aisladas

Uno de los criterios a tener en cuenta a la hora de elegir la cepa es que tenga fenotipo killer, de esta forma puede suprimir a otras cepas silvestres no deseadas para dirigir la fermentación, evitando la obtención de un producto final con características sensoriales no deseables.

Dos factores importantes que influyen en la actividad de la cepa killer son la temperatura y el pH, debido a que la actividad killer manifiesta actividades máximas a una temperatura de 22°C y valores de pH entorno a 4.5, manifestándose en menor medida a temperaturas y pH diferentes a estos.

9.4 PRUEBA DE OSMOTOLERANCIA

Las cepas aisladas se sometieron a un medio con altas concentraciones de sustrato (glucosa), para observar el efecto de estas concentraciones en el crecimiento de cada una de las cepas (Figura 14, 15, 16 y 17).

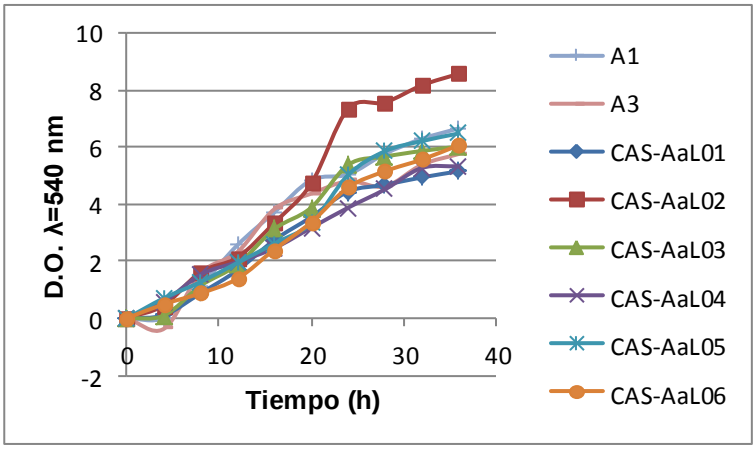


Figura 14. Prueba de osmotolerancia a 200 g/L

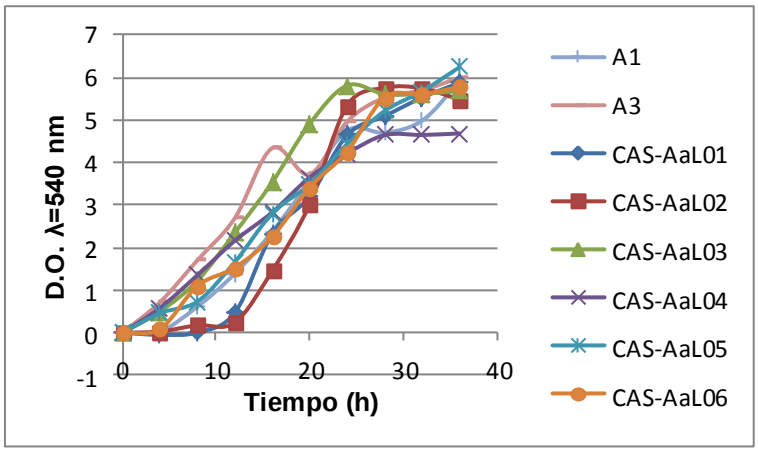


Figura 15. Prueba de osmotolerancia a 250 g/L

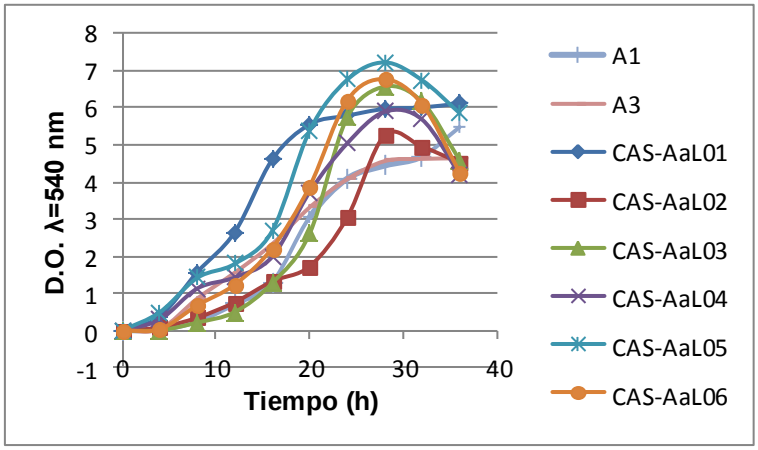


Figura 16. Prueba de osmotolerancia a 300 g/L

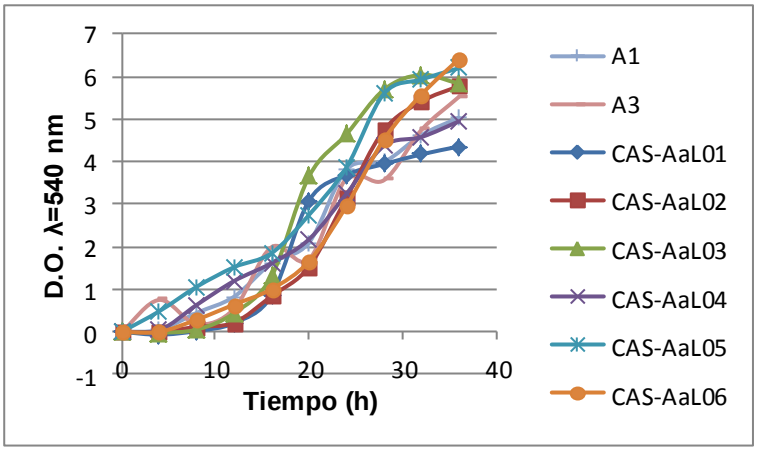


Figura 17. Prueba de osmotolerancia a 350 g/L

La importancia de esta prueba fue debido a que los mostos de fermentación contienen altas concentraciones de carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa, utilizados como sustrato y fuente de energía para la producción de etanol.

Al evaluar el efecto de altas concentraciones de glucosa (200, 250, 300 y 350 g/L), se observó que el crecimiento de las levaduras no se vio afectado totalmente, sin embargo, el crecimiento de las levaduras fue mayor a una concentración de glucosa de 200 g/L. Con esta concentración se destacó el comportamiento de la cepa CAS-*Aa*L02, la cual presentó el mayor crecimiento a las 36 horas.

En la concentración de 300 g/L se destacó el crecimiento de la cepa de levadura CAS-*Aa*L05, seguida de las cepas CAS-*Aa*L06 y CAS-*Aa*L03, a las 28 horas.

En cuanto a la concentración de 350 g/L, todas las cepas de levadura tuvieron un comportamiento similar en su crecimiento, sin embargo, la cepa CAS-*Aa*L06 fue la que obtuvo un mayor crecimiento a las 36 horas.

Cabe mencionar que la determinación de crecimiento por densidad óptica es un método indirecto, además de que los valores de absorbancia nos expresan tanto células vivas como muertas.

El descenso de crecimiento de las levaduras bajo las concentraciones de glucosa evaluadas pudo ser consecuencia de la respuesta primaria hacia el estrés osmótico al que estuvieron expuestas continuamente las levaduras.

Las elevadas concentraciones de solutos en el medio conducen a la plasmólisis celular, recesión de la membrana citoplasmática respecto a la pared celular y una posible reducción en el tamaño de poro (Casas, 1999).

El efecto de la presión osmótica varía de una cepa a otra. El mecanismo de resistencia de las levaduras en medios con actividad de agua baja se explica por la acumulación en la célula de polioles para minimizar la diferencia de presión osmótica entre la célula y el medio (Uribe, 2007).

9.5 PRUEBA DE TOLERANCIA A ETANOL

Las cepas aisladas se sometieron a un medio con diferentes concentraciones de etanol, para observar el efecto de estas concentraciones en el crecimiento de cada una de las cepas (Figuras 18, 19 y 20).

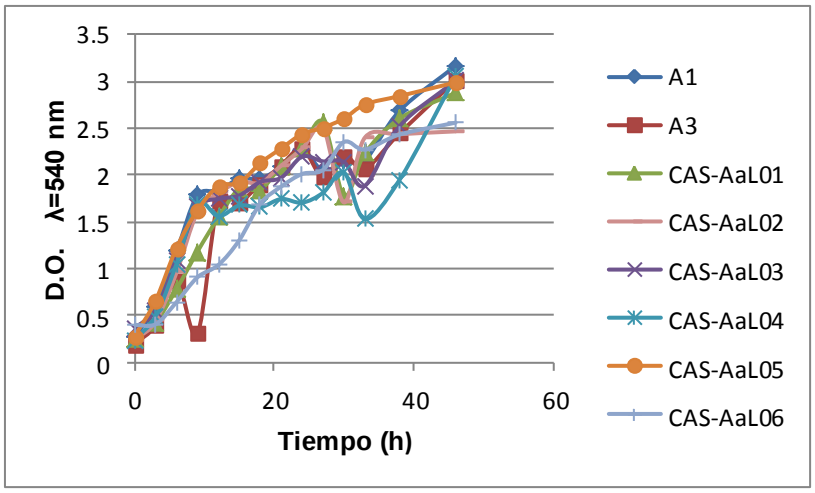


Figura 18. Prueba de tolerancia a etanol a 5%

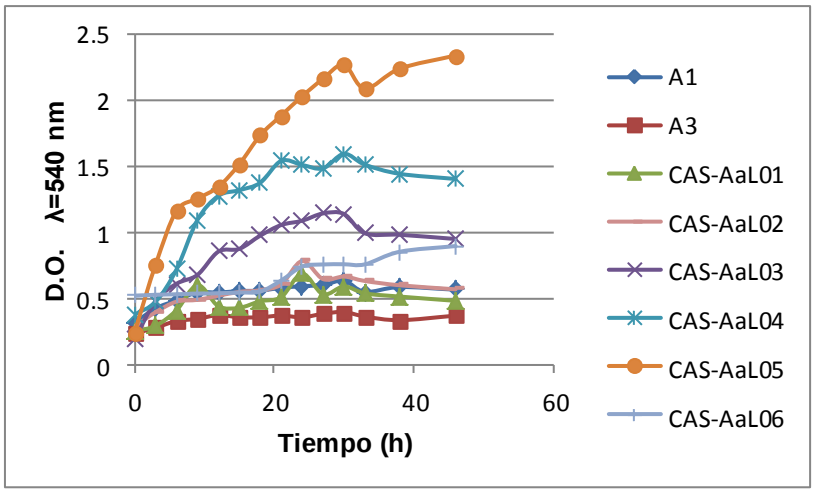


Figura 19. Prueba de tolerancia a etanol a 10%

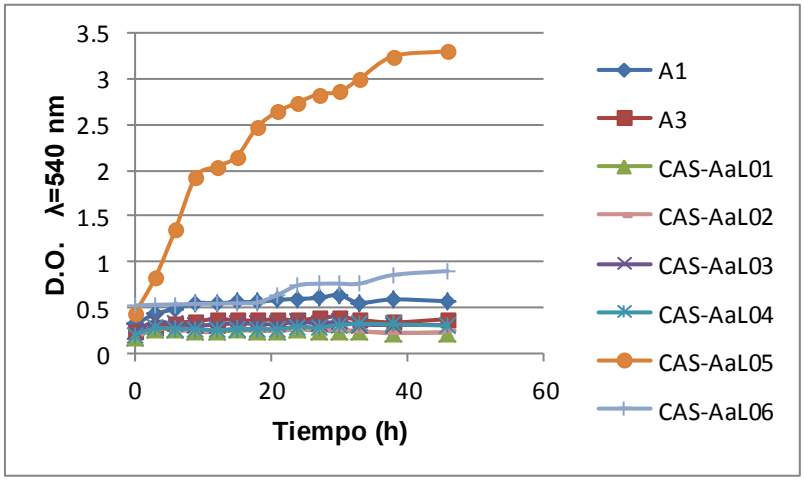


Figura 20. Prueba de tolerancia a etanol a 15%

Esta prueba es importante debido a que la acumulación extracelular de etanol en el medio es la causa del descenso en la fermentación, Dombeck (1988) e Ingram (1989), mencionan que este descenso comienza a concentraciones extracelulares de etanol relativamente bajas, entre 1% y 2% (p/v). Según estos autores, cuando el etanol extracelular alcanza una concentración del 5%, tiene lugar una pérdida del 50% de la actividad metabólica.

Dombeck (1988) e Ingram (1989), también hacen mención que el descenso en la actividad fermentativa coincide con la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria de crecimiento, y esta transición supone numerosos cambios fisiológicos, pues la maquinaria celular cambia de una actividad biosintética

intensa a una actividad, fundamentalmente, de mantenimiento.

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de etanol (5, 10 y 15% v/v), se observó que la cepa de levadura CAS-*Aa*L05 fue la que mejor toleró las tres diferentes concentraciones, debido a que no hubo disminución en su crecimiento. Sin embargo, el resto de las cepas de levadura si se vieron afectadas por las altas concentraciones, ya que hubo una inhibición en el desarrollo de su crecimiento.

La tolerancia de las levaduras al etanol se debe a que la célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la disminución de la fluidez que produce el etanol. La adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas básicamente debida a un enriquecimiento de las mismas en esteroles y ácidos grasos de cadena larga (Tomasso, 2004).

9.6 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL (MÉTODO DE OXIDACIÓN DEL DICROMATO)

Se empleó el método de oxidación del dicromato para cuantificar la concentración de etanol en los medios de cultivo de las diferentes cepas aisladas (Figura 21).

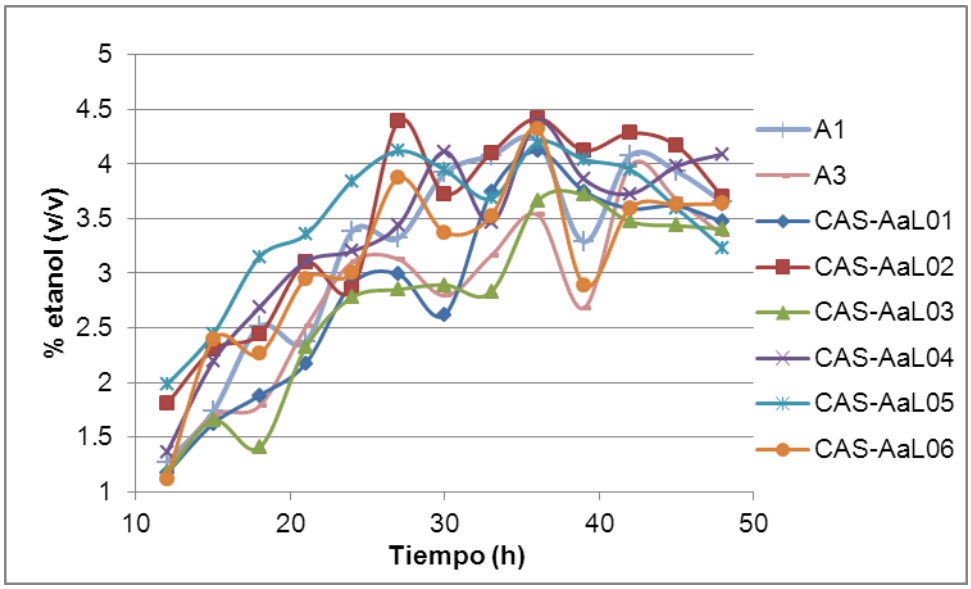


Figura 21. Producción de etanol de las cepas aisladas

El método de la oxidación del dicromato ha sido un sustituto de la destilación para cuantificar la concentración de etanol porque el proceso de destilación consume tiempo y es laborioso.

El medio de cultivo contiene una variedad de nutrientes (monosacáridos, sales, iones metálicos, etc.) y productos tales como el glicerol, los cuales pueden reaccionar con el dicromato. Por lo tanto, la extracción del etanol en el medio de cultivo es esencial antes de realizar el método para que este pueda ser realizado sin interferencia, por lo que se utilizó fosfato de tributilo (TBP) como solvente para la extracción de etanol en el medio de cultivo.

Durante el proceso de fermentación en medio sintético, se observó que a las 36 horas la mayoría de las cepas generaron mayor porcentaje de etanol, entre 4 y 4.5 % (v/v), destacándose la CAS-*Aa*L02; a excepción de las cepas A3 y CAS-*Aa*L03 que generaron un porcentaje de etanol entre 3.5 y 4% (v/v).

En cuanto a las 48 horas la cepa que generó mayor porcentaje de etanol fue la cepa de levadura CAS-*Aa*L04.

9.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO EL DENSÍMETRO

Previo a este trabajo Ana Karen Espinoza Arrioja y Ana Laura Guzmán Rabasa aislaron cepas de levaduras del aguamiel en el año 2011 con el objetivo de optimizar la fermentación para la producción de etanol en la empresa Comiteco Balún Canán S. de R.L. de C.V., empleando mieles de agave y panela como sustratos en la fermentación. De cinco cepas que aislaron, dos de ellas A1 y A3 obtuvieron mejores rendimientos en base a la producción de etanol, sin presentar diferencia significativa, por lo que fue necesario realizar un análisis sensorial a los destilados de estas cepas, evaluando la fase visual, olfativa y gustativa, obteniendo un mejor perfil sensorial los destilados de la cepa A3 con características de mentol, hierba recién cortada, champiñón, flores blancas, azahar, manzanilla, lima, limón, yogurt, mantequilla, azúcar mascabada y melaza, por ello fue seleccionada la cepa A3.

Con la cepa A3 se desarrollaron procesos de fermentación empleando tres diferentes proporciones de miel de agave: miel de panela (60:40, 65:35 y 70:30) y sulfato de amonio a diferentes tiempos de fermentación (24, 48 y 72 horas), como se menciona en el apartado 8.3.

Según en el apartado 6.3 de la NOM-006-SCFI-2005 una bebida alcohólica es susceptible de ser enriquecida con otros azúcares en el proceso de formulación hasta en una proporción no mayor de 49 % de azúcares reductores totales, es por ello la importancia de evaluar las diferentes proporciones de miel de agave y miel de panela y así obtener la denominación de origen, la cual garantiza a los

consumidores la autenticidad del producto y proteger los derechos de los productores.

Los destilados obtenidos de cada proceso de fermentación fueron evaluados en cuanto a su rendimiento (Cuadro 8).

Cuadro 8. Caracterización de los destilados obtenidos de los diferentes procesos de fermentación

Unidad experimental	% etanol en el destilado (v/v) ml etanol/ 100 ml destilado	% destilado (v/v) ml destilado/ 100 ml mosto
60:40-24	69.2433 ± 8.9366	2.7049± 2.0706
60:40-48	69.7533 ± 1.3054	4.1868 ± 0.5286
60:40-72	67.2533 ± 6.1922	2.6284 ± 0.6640
65:35-24	70.0666 ± 1.9686	1.3141 ± 0.2383
65:35-48	67.8466 ± 1.5200	3.8838 ± 0.2811
65:35-72	64.38 ± 7.1996	2.6969 ± 0.5261
70:30-24	70.62 ± 2.6599	1.6266 ± 0.1744
70:30-48	62.1466 ± 5.5107	3.3666 ± 1.2805
70:30-72	66.4533 ± 2.8020	3.63719 ± 0.3757

Para elegir los tres mejores procesos se tomaron en cuenta aquellos que generaron mayores porcentajes de destilado (v/v), así como porcentajes de etanol en el destilado, resultando para ello los procesos 60:40-48, 65:35-48 y 70:30-72.

9.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS DESTILADOS EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no-volátiles, cuya mezcla compleja define sus atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor.

La mayor producción de etanol se registró en las unidades 60:40-48 horas, 65:35-48 horas y 70:30-72 horas, sin observarse diferencia estadística significativa, por lo que los destilados fueron analizados por CG-MS para determinar sus compuestos volátiles (Cuadro 9). El análisis reportó la presencia de alcoholes superiores, ésteres, y acetal.

Cuadro 9. Compuestos volátiles presentes en los destilados

Compuesto	60:40-48	65:35-48	70:30-72
Etanol	96.3736	98.9117	96.3566
Acetato de etilo	0.34328	0.07948	0.204977
Acetaldehído	0.59539	0.119349	0.361768
1-propanol	0.86837	0.138574	0.53487
2-metil, 1-propanol	0.25748	0.017583	0
3-metil, 1-butanol	0.98769	0.163534	1.48796
2-propanona	0.0795	0.077497	0
Acetal	0.34182	0.074068	0.078114
1-pentanol	0.15288	0	0
2,3-dimetildiaziridina, 1-n-butoxi	0	0.41821	0.122445

Los compuestos etanol, metanol y alcoholes superiores que están presentes en las bebidas alcohólicas destiladas, se producen en mayor concentración y por su alto grado de toxicidad están regidos por las Normas Oficiales Mexicanas (Vera *et al.*, 2009).

Los compuestos volátiles tienen diferente origen: a) Pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo; o b) Pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Vera *et al.*, 2009).

Los procesos seleccionados anteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases presentando un mayor porcentaje en abundancia de etanol el proceso 65:35-48, así como también los valores más bajos en cuanto a los alcoholes superiores comparados con los procesos 60:40-48 y 70:30-72.

Posteriormente, para elegir la proporción y el tiempo de fermentación adecuado para la producción de la bebida espirituosa, se realizó un segundo análisis sensorial para evaluar su fase visual, olfativa, gustativa y su perfil sensorial (Cuadro 10), siendo las muestras diluidas con agua desionizada a una concentración de 35 % (v/v) de destilado.

Cuadro 10. Análisis sensorial de los destilados

Análisis	60:40-48h	65:35-48h	70:30-72h
Fase visual	3.5[a]	3.25[a]	3.25[a]
Fase olfativa	4.25[a]	7.25[b]	6.5[b]
Fase gustativa	3.75[a]	4.75[b]	3.25[a]
Perfil sensorial	Éter, solvente, aceituna, pan, manzana, hierbas, picante, sábila.	Floral, azahar, acacia, nueces, avellanas, vinagre, lima, durazno, manzana, dulce.	Setas, musgo, champiñón, tierra, humedad, manzana oxidada, mantequilla, mentol, frutal.

Los resultados en la fase visual no mostraron diferencia estadística entre los destilados. Caso contrario ocurrió en la fase olfativa y gustativa, donde el destilado con la proporción 65:35 a las 48 horas obtuvo la mayor puntuación y el perfil sensorial con mayor aceptación entre el panel de jueces entrenados. La variación del perfil sensorial entre los destilados se atribuye a las diferentes percepciones que originan los compuestos volátiles dependiendo de su concentración en las bebidas alcohólicas. En base a estos resultados, se realizó la producción de la bebida espirituosa con la cepa A3, un mosto con proporción 65:35 (miel de agave: miel de panela) y un tiempo de fermentación de 48 horas.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La identificación y aislamiento de las cepas de levadura que se encuentran de manera natural en el aguamiel, es un motivo de estudio a fin de encontrar microorganismos que trabajen de una mejor manera en la fermentación del aguamiel, generando mayores rendimientos de alcohol e inclusive mejores características organolépticas.

Las diferentes pruebas realizadas como fenotipo killer, osmotolerancia, tolerancia a etanol, azúcares fermentables y cuantificación de etanol, permitieron caracterizar a las cepas aisladas.

Todas las cepas de levaduras produjeron etanol aunque en diferentes concentraciones, destacándose en la mayoría de ellas su mayor porcentaje de etanol a las 36 horas.

Durante la fermentación no hay que descartar la producción de otros metabolitos que influyen considerablemente en el sabor del producto final.

La estandarización del proceso logró establecer los parámetros para la producción de una bebida espirituosa con características organolépticas aceptables, siendo la proporción 65:35 (miel de agave:miel de panela) y un tiempo de fermentación de 48 horas, adecuadas para la producción de la bebida.

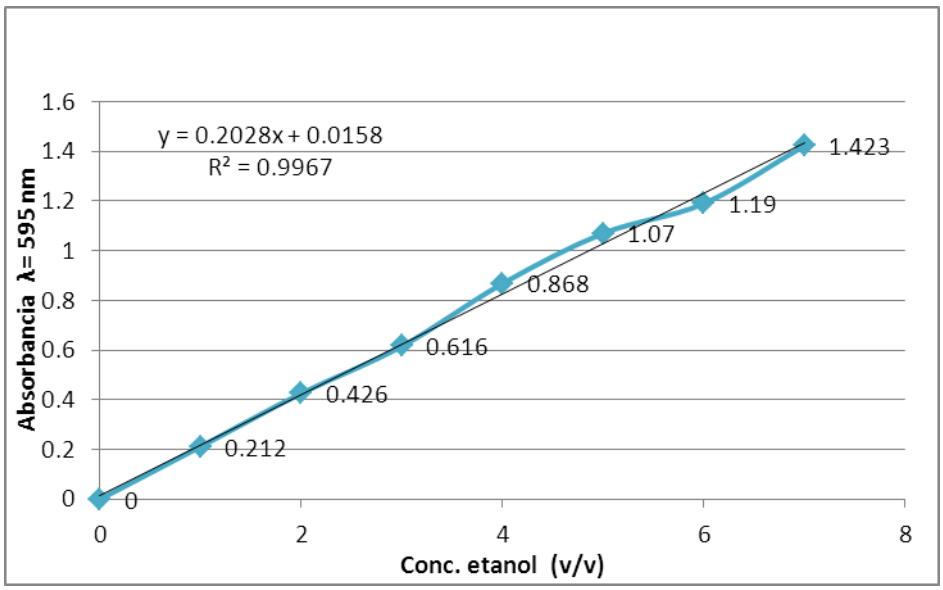
Es de suma importancia hacer una caracterización fisicoquímica de las mieles de agave y panela, utilizadas como sustratos en la fermentación, así como el identificar cada una de las cepas aisladas y realizar un muestreo más amplio del aguamiel en diferentes épocas del año, ya que las características de las levaduras pueden variar, así como las especies presentes en la muestra recolectada.

Con la finalidad de conocer la rentabilidad del producto sería conveniente la realización de un estudio de mercado.

11. ANEXOS

11.1 Curva patrón de dicromato de potasio

Conc. Etanol (v/v)	Abs
0	0
1	0.212
2	0.426
3	0.616
4	0.868
5	1.07
6	1.19
7	1.423
8	1.436



11.2 Estandarización de la técnica de semilleo

Semilleo con A3 para fermentación 70:30

t (min)	Hora	Punto crítico	Vol. miel agave 12°Bx	Vol. Miel panela 12°Bx	sulfato de amonio	Volumen total	células/ml (x10^4)
10	19:20	-	6.5 ml				
20	19:30	-	6.5 ml				
30	19:40	-	6.5 ml				
40	19:50	-	6.5 ml				
55	20:05	-	13 ml				
70	20:20	-	13 ml				
85	20:35	-	13 ml				
100	20:50	-	200 ml				
810	08:50	9/11	400 ml		0.23 g	690 ml	27500
1070	13:10	9/11	600 ml	552 ml	0.46 g	1842 ml	
1470	20:50	9.5/11	910 ml	390 ml	1.38 g	3142 ml	14300
2130	07:55	10/11.5	1300 ml	560 ml	18.73 g	5002 ml	14800

Semilleo con A3 para fermentación de 65:35

t (min)	Hora	Punto crítico	Vol. miel agave 12°Bx	Vol. Miel panela 12°Bx	sulfato de amonio	Volumen total	células/ml (x10^4)
10	19:20	-	6.5 ml				
20	19:30	-	6.5 ml				
30	19:40	-	6.5 ml				
40	19:50	-	6.5 ml				
55	20:05	-	13 ml				
70	20:20	-	13 ml				
85	20:35	-	13 ml				
100	20:50	-	200 ml				
800	08:50	9/11	400 ml		0.23 g	690 ml	28100
1070	13:10	9/11	500 ml	642 ml	0.46 g	1832 ml	
1470	20:50	9.5/11	859 ml	462 ml	1.38 g	3153 ml	16400
2130	07:55	10/11.5	1200 ml	650 ml	18.73 g	5003 ml	17100

Semilleo con A3 para fermentación de 60:40

t (min)	Hora	Punto crítico	Vol. miel agave 12°Bx	Vol. Miel panela 12°Bx	sulfato de amonio	Volumen total	células/ml (x10^4)
10	19:20	-	6.5 ml			31.5 ml	
20	19:30	-	6.5 ml			38 ml	
30	19:40	-	6.5 ml			44.5 ml	
40	19:50	-	6.5 ml			51 ml	
55	20:05	-	13 ml			64 ml	
70	20:20	-	13 ml			77 ml	
85	20:35	-	13 ml			90 ml	
100	20:50	-	200 ml			290 ml	
810	08:40	9/11	400 ml		0.23 g	690 ml	30800
1070	13:10	9/11	400 ml	710 ml	0.46 g	1800 ml	
1470	20:50	10/11	700 ml	466 ml	1.38 g	2966 ml	18450
2130	07:55	7/9	1200 ml	800 ml	18.73 g	4966 ml	18375

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, MG., (1998). Caractérisation cinétique et metabolique d' une souche *Brettanomyces*. Tesis Doctoral. I.P.N. Toulouse, Francia.

Asociación Mexicana de Microbiología. (1998). Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 110.

Bautista Cruz, N. (2006). Estudio químico-bromatológico y elaboración de néctar de aguamiel de Agave americana L. (manguey) procedente de Ayacucho. Lima, Perú.

Bautista Justo, M., García Oropeza, L., Barboza Corona, J. E., & Parra Negrete, L. A. (Agosto de 2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. Guanajuato, México.

Beltrán, G., Zarzoso, B. E., Rozés, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the Timing of Nitrogen Additions during Synthetic Grape Must Fermentations on Fermentation Kinetics and Nitrogen Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 996.

Berreta, T. (23 de Junio de 2003). Fluidez de la membrana.

Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología.* Ed. Médica Panamericana.

Casas Alcantarilla, E. (Marzo de 1999). Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados. Madrid.

Cascante Torres, D. A. (Enero de 2004). Proyecto de producción y tecnificación de panela granulada y miel de caña de azúcar. Quito, Ecuador.

Cruz, N. B. (2006). Estudio químico – bromatológico y elaboración de néctar de aguamiel de Agave americana L. (manguey) procedente de Ayacucho.

de la Peña Sobarzo, P. (2008). Hacia el rescate del agave comiteco. *El faro*, 7.
Deak, T.; Beuchat, L.R. (1996) Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Ratón, Florida.

de León Rodríguez, A., González Hernández, L., Barba de la Rosa, A. P., Escalante Minakata, P., & G. López, M. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave salmiana. Agricultural and food chemistry. 1337-1341.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith , F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances .

Ehsani, M., Murat, M. L., Moine, V., Renouf, V., Puente, V., S. Velasco, S., y otros. (2011). Análisis de la asimilación por las levaduras de las formas orgánica y mineral del nitrógeno, durante la fermentación alcohólica. Estudio del impacto sobre la cinética fermentativa. *Laffort Info*, 1.

Espinosa P.H., C. Arredondo, M.A. Cano, A.M. Canseco y F. Vázquez. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño. Catálogo de la diversidad de agaves. Folleto técnico No. 2, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-

SAGARPA, Oaxaca, 68 pp.

FAO. (1997). Los Carbohidratos en la nutrición humana. Roma: Food & Agriculture Org.

García Cortés, V. (s.f.). *Introducción a la Microbiología.* EUNED.

Hidalgo Torres, J. (2010). *Tratado de enología.* Madrid, España: Mundi- Prensa.

Hyun, B. S., Hyum, J. K., Oh, K. L., Ji, H. H., Hyeon, Y. L., & Kyung, H. J. (2008). Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol. 285-291.

Jurado López , S. E., & Sarzosa Pazmiño, X. S. (Junio de 2009). Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y licor de cabuya. Quito, Ecuador.

Macarulla, J. M., & Goñi, F. M. (1994). *Bioquímica humana.Curso básico.* Barcelona: Reverté, S.A.

Mariscal Moreno, J. P. (2011). Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Manizales, Colombia.

Melo Ruiz, V., & Cuamatzi, Ó. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. México: Reverté S.A.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31-426

Muller, L. E. (1964). *Manual de Laboratorio de Fisología Vegetal.* Turrialba, Costa Rica: SIC.

Ortiz Bravo, E. G. (Marzo de 2006). Influencia de glicina o sulfato de amonio en la fermentación de Agave potatorum Zucc (Tobalá). Huajuapan de León, Oaxaca.

R. Gibson, B., J. Lawrence, S., D. Powell, C., Leclaire, J., & A. Smart, K. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling . *Blackwell Publishing Ltd.*, 539.

Ramírez Nieto, G. M., & Pedroza Florez, J. F. (2001). Desarrollo de una fermentación alcoholica a pH regulado y temperatura de 25°C en el biorreactor bioflo 3000 M1227 y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo. Bogotá.

Restaino, L.; Bills, S.; Tschemeff, K.; Lenovich, L.M. (1983) Growth characteristics of *Saccharomyces rouxii* isolated from chocolate syrup. Appl. Environ. Microbiol. 45 (5), 1614-1621.

Reynoso Santos, R., García Mendoza, J. A., López Báez, W., & Lopez Luna, A. (2011). Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. 1-11.

Rivero, A., Morongiu, R., Lopes, C., Sangorrin, M., & Caballero, A. (2006). Caracter killer de levaduras patagonicas de origen enológico y su potencial aplicación en el control de contaminantes industriales y oportunistas. 1.

Rodríguez Rivera, V. M., & Magro, E. S. (2008). Bases de la Alimentación Humana. España: Netbiblo.

Rodríguez, L. A., & Abad, D. (1998). Fenotipo killer: Distribución en la Comarca de la Ribeira Sacra en las Poblaciones de Saccharomyces cerevisiae. *Ciencia y Tecnologia alimentaria*, 34.

Salcedo Cárdenas, M. E. (Agosto de 2008). Aislamiento y selección de levaduras fermentadoras de melaza de caña de azúcar (Saccharum officinarum). Morelia, Michoacán.

Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas.

Spencer, J., & Spencer, D. M. (1990). *Yeast Technology.*

Togores, J. H. (2011). Tratado de Enología. Mundi-Prensa Libros.

Tokuoka, K.; Ishitani, T. (1991) Minimum water activities form the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. J. Gen. Appl. Microbiol. 37, 111-119.

Tomasso, M. (2004). Osmotolerancia. Uruguay.

Tomasso, M. (2004). Tolerancia de las levaduras al etanol. Uruguay.

Trueba, L. A. (2007). Los destilados de Agave en México y su denominación de origen.

Uribe Gutiérrez, L. A. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Bogotá.

Vera Guzmán, A. M., Santiago García, P. A., & López, M. G. (Octubre-Diciembre de 2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum . México.

Yuan, L. (2006). Microbial Biotechnology: Principles and Applications. Capítulo 8. World Scientific. Pp. 348-357