



OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE TEQUILA, UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)

OPTIMIZATION OF FERMENTATION PROCESS FOR TEQUILA PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)

P. Téllez-Mora^{1,2*}, F. A. Peraza-Luna², A. Feria-Velasco³ e I. Andrade-González¹

¹Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco, km 10 Carr. San Miguel Cuytlán; Tlajomulco de Zúñiga, Jal. CP 45640. México.

²Instituto Tecnológico de Tizimín, km 3.5 Carr. final aeropuerto Cupul a Tizimin s/n CP 97900. Yucatán México.

³Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco. México.

Recibido 9 de Septiembre 2011; Aceptado 23 de Enero 2012

Resumen

El objetivo del trabajo fue optimizar las concentraciones de azúcar, nitrógeno y fósforo del medio, para incrementar la eficiencia en la producción y establecer la influencia de esos macronutrientes en los compuestos sensoriales indicados en la normatividad Mexicana (NOM -006-SCFI-2005). Se utilizaron dos cepas de levaduras *Saccharomyces* y dos tipos de mosto: 100% *Agave* y Mixto (*Agave* más sacarosa). En un principio se utilizó un diseño factorial (2^{4-1}). Variables a controlar: concentración de azúcar; nitrógeno y fósforo; y la temperatura. Variables de respuesta: Eficiencia de fermentación y las concentraciones de los compuestos indicados en la NOM. Por mínimos cuadrados se determinó la función objetivo para cada variable de respuesta con sus restricciones. Para una eficiencia de 94.58% (con una función deseable de 0.891312), el programa sugirió: mosto mixto (*Agave* y sacarosa), *Saccharomyces* THL 110; 8°Bx; 0.797979 g/l N; 0.376875 g/l P, y 40 °C.

Palabras clave: optimización, *Saccharomyces*, *Agave (tequilana)*, fermentación, macronutrientes, tequila.

Abstract

The objective of this work was to optimize sugar concentrations, nitrogen and phosphorus in the medium, in order to increase the efficiency production, establishing the influence of these macronutrients in the flavor compounds listed in the Mexican legislation (NOM-006-SCFI-2005). It was used two strains of *Saccharomyces* yeasts and two types of must: 100% *Agave* and mixed *Agave* (*Agave* plus sucrose). At first it was used a factorial design (2^{4-1}). Control variables: sugar concentration, nitrogen and phosphorus, and temperature. Response variables: fermentation efficiency and concentrations of the compounds listed in the NOM. The objective function was determined by minimum squares for each response variable with its restrictions. For the efficiency of 94.58% (with a desirable function of 0.891312), the program suggested, mixed *Agave* (*Agave* and sucrose), *Saccharomyces* THL 110; 8°Bx; 0.797979 g / l N; 0.376875 g / l P, and at 40 °C.

Keywords: optimization, *Saccharomyces*, *Agave (tequilana)*, fermentation, macronutrients, tequila.

*Autora para la correspondencia. E-mail: paty16@yahoo.com.mx
Tel. y Fax 52 (33)3772 4426

1 Introducción

En la industria del tequila, el proceso de fermentación es muy importante debido a que involucra biotransformación de azúcares en diversos alcoholes y compuestos aromáticos, que colaboran para dar a cada bebida su identidad distintiva en olor y sabor; por lo que el papel que desempeñan las levaduras es fundamental. Sin embargo la biosíntesis de alcoholes es influenciada por el tipo de cepas participantes, composición y concentración del medio y las condiciones de fermentación (Bohlscheid y col., 2007; Bely y col., 2003; Arrizón y Gschaedler, 2002; Pinal y col., 1997, Melero, 1992). Respecto a los microorganismos participantes, existen estudios sobre la sucesión de levaduras y bacterias durante la fermentación de mostos no estériles (Lachance, 1995; Rainieri y Pretorius, 2000). En el caso de la industria del tequila, el uso de mostos estériles incrementaría el costo, y una solución sería incrementar el volumen de inoculación con la levadura de interés. La principal ventaja de las fermentaciones con levaduras seleccionadas e inoculadas es que son fermentaciones más rápidas dando bebidas con una calidad más consistente (Shuang y Yan, 2010; Mills y col., 2002; Melero, 1992; Torrea y Azpilicueta, 2002; Bely y col., 2003).

En cuanto a la composición del medio y su concentración, particularmente en la producción de tequila, la cantidad de nitrógeno asimilable juega un papel importante en la duración y desarrollo del proceso, ya que además de influir en la velocidad de la fermentación el nitrógeno es precursor de algunos compuestos volátiles (Molina y col., 2007; Arrizón y Gschaedler, 2007; Bely y col., 2003; Torrea y Azpilicueta, 2002; Pinal y col., 1997; Albers y col., 1996). Su deficiencia causa aletargamiento ó detención de la fermentación. Se ha reportado que cuando se trabaja con concentraciones elevadas de azúcar (mayor ó igual a 180 g/L), el crecimiento y la viabilidad de la levadura decrece debido al stress osmótico y a la presencia de algunos inhibidores, tales como el etanol, CO₂, ácidos grasos saturados de 6, 8 y 10 átomos de carbono y algunos pesticidas implicados en el cultivo agrícola, los cuales inhiben el transporte de azúcar (Munoz e Ingledew, 1989). Esta inactivación suele presentarse en las levaduras carentes de amonio (Salmon, 1989, Wang y col., 2003; Bohlscheid y col., 2007). Para evitar estos problemas tecnológicos además de la adición de factores de supervivencia como el oxígeno, esterol y ácidos grasos insaturados, la utilización de nitrógeno asimilable en

forma de sales de amonio ó aminoácidos (ya sean solos o combinados) ha ofrecido buenos resultados durante la fermentación de mostos con nitrógeno limitado, ya que ayudan exitosamente a evitar este problema, que se ha reportado ser eficaz sólo durante la fase temprana de crecimiento (Salmon, 1989, Munoz e Ingledew, 1989; Arrizón y Gschaedler, 2002).

Dentro de las condiciones de cultivo, la temperatura es otro factor importante ya que afecta el metabolismo de la levadura y como resultado se obtiene la formación de metabolitos secundarios (como glicerol, ácido acético, ácido succínico, alcoholes superiores) (Torija, M.J et al., 2003, Pinal y col., 1997); temperaturas altas (por arriba de los 20°C en el caso de los vinos y/ó producción de cerveza) favorecen la producción de alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos, mientras que temperaturas entre los 5°C y los 15°C favorecen particularmente la producción de acetaldehído y diacetilo (Nevdovic V.A., 2006).

Una práctica común en la industria es la adición de una fuente de nitrógeno como medida previsoras para favorecer el metabolismo de la levadura, en mostos donde se desconoce tanto la composición de los nutrientes como los requerimientos de la levadura, lo que causa u ocasiona un desequilibrio en el mosto y una generación de cambios en la composición final del producto, afectando con ello el rendimiento (baja producción de alcohol, con mayor cantidad utilizada de *Agave*) y la calidad (alterando la producción de compuestos sensoriales, generando compuestos no deseados) (Arellano y col., 2008). Según el Consejo Regulador del Tequila (CRT) (2005), las principales fuentes de nitrógeno que industrialmente se utilizan son sulfato de amonio, fosfato de amonio y urea, donde las concentraciones varían desde 0.1 hasta 1.0 g/L. El objetivo del presente trabajo fue optimizar las concentraciones de azúcar, nitrógeno y fósforo, en un mosto tequilero, para incrementar la eficiencia en la etapa de fermentación durante la producción de tequila, evaluando la biosíntesis de los compuestos indicados en la norma oficial que lo regula (NOM-006-SCFI-2005).

2 Materiales y métodos

2.1 Selección de cepa de levadura

Una etapa preliminar del trabajo fue la selección de las cepas, con este fin se trabajaron cuatro levaduras aisladas de mostos tequileros, caracterizadas

en trabajos previos y propiedad de la empresa. Las cepas de *Saccharomyces* sp se identificaron como THL 013, THL 014, THL 018 y THL 110.

El criterio de selección se hizo considerando tres de los aspectos primordiales en esta industria: (1) eficiencia de la fermentación (respecto a la ecuación teórica del rendimiento máximo 0.511); (2) cumplimiento de los compuestos indicados en la normatividad mexicana (NOM 006 SCFI 2005) y (3) la generación de compuestos sensoriales de olor y sabor, evaluado mediante el panel de jueces de la empresa.

2.2 Cinéticas de fermentación

El medio utilizado en la selección se preparó con un lote de jugo de *Agave* y sacarosa (mosto mixto) a 10 °Brix, adicionado con 0.1 g/L de sulfato de amonio, Se utilizaron matraces erlenmeyer de 1L de capacidad con 750 ml del medio y se esterilizaron durante 10 min a 110°C. Cada matraz fue inoculado con 50 mL de la levadura correspondiente, crecida previamente durante 12 horas en un agitador orbital a 30 °C y 250 rpm. Los matraces se incubaron a 35°C por 72 h. Las determinaciones realizadas al inicio y final de la fermentación fueron: ARD, ART, población por cuenta directa al microscopio y riqueza alcohólica.

2.3 Análisis de concentración de alcohol y compuestos de NOM

Para la determinación de la riqueza alcohólica del mosto, en un microdestilador con recirculación de agua fría, se destilaron 5 mL del mosto a analizar, ajustado a 20°C se le adicionaron 3 mL de agua destilada y se recuperaron 5 mL del destilado a la misma temperatura de entrada, se le determinó la concentración de alcohol en el densímetro digital (DMA) (de acuerdo a la norma mexicana NMX - V - 013-Normex-2005) y de éste destilado 2 mL se llevaron al cromatógrafo de gases para analizar los compuestos indicados en la norma mexicana NOM 006 SCFI 2005, de acuerdo al procedimiento indicado en NMX-V- 005-Normex-2005 y además, se determinó furfural mediante la técnica indicada en la norma NMX-V- 004-Normex-2005.

2.4 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial, se realizó con una destilación simple, para obtener una muestra conocida como ordinario del medio final de la fermentación. Todo el

ordinario se ajustó a una concentración de alcohol del 15% (v/v), mediante un cálculo en la concentración final del grado alcohólico de cada uno de los mostos, empleando la fórmula $V_1C_1=V_2C_2$, donde V_1 es el volumen del medio final de la fermentación; C_1 grado alcohólico final de la muestra y C_2 , la concentración deseada de 15%, el V_2 , volumen a obtener para la muestra de ordinario. Posteriormente las muestras fueron analizadas por siete jueces entrenados en análisis de materia prima, mostos muertos (medio de fermentación al tiempo final), ordinarios y producto final (tequila). Mediante una prueba hedónica se asignaron valores desde 1 (desagrado total) hasta 7 (máximo agrado) dependiendo de la aceptación de cada persona. Los resultados de las calificaciones otorgadas se sometieron a un análisis de varianza bloqueando el efecto del juez.

Todos los ensayos realizados fueron por duplicado y los resultados se analizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus.

2.5 Análisis de la etapa de fermentación

En esta etapa se utilizó un diseño estadístico factorial fraccionado 2^{4-1} , completamente al azar, manteniendo como bloque la levadura y el mosto por ser variables no continuas.

Las cepas de *Saccharomyces* sp utilizadas en la siguiente etapa fueron las identificadas como THL-018 y THL-110, en dos tipos de mostos de *Agave*: mixto y 100%, con la siguiente combinación:

- a). THL 110 y mosto 100%
- b). THL 110 y mosto mixto
- c). Levadura THL 018 y mosto 100%
- d). THL 018 y mosto mixto

Las variables independientes fueron la concentración de azúcar (Azúcar) de 8 y 15 °Brix; concentración de nitrógeno de acuerdo a la adición extra al mosto (N) de 0 y 0.5 g/L de nitrógeno; concentración de fósforo de acuerdo a la adición extra al mosto (P) de 0 y 0.3 g/L de fósforo y la temperatura (T) de 20°C y 40°C. Las variables de respuesta (dependientes) fueron: eficiencia de fermentación (%E) (respecto a la ecuación teórica de rendimiento máximo 0.511) y concentración de los compuestos indicados en la norma oficial del tequila (NOM-006-SCFI-2005).

Para evitar tener la influencia de la composición del medio en cada una de las cinéticas de fermentación

del diseño estadístico, se realizó un lote con el medio basal preparado bajo las mismas condiciones tanto para los medios con mostos mixtos como para los de 100% *Agave*. Se trabajó con un lote de 55 L de jugo de *Agave* alto en °Brix (obtenido del primer molino), se separó una parte de este jugo a 20 °Brix, se llenaron 47 botellas de 1L con 750 ml de este medio (100% *Agave*).

Para las muestras de mosto mixto se tomó la otra parte del jugo a 20 °Brix se hicieron los cálculos para tener una relación de 51% de los azúcares provenientes de *Agave* y el 49% de otros azúcares (sacarosa en este caso) considerando tener al final el °Brix también de 20. Los frascos se esterilizaron 10 min a 110 °C. Después que se enfriaron se llevaron a congelar hasta su uso. La formulación se realizó hasta su uso de acuerdo a la hoja de diseño.

Para la adición de las fuentes se prepararon soluciones concentradas y se esterilizaron por ultrafiltración. En la preparación de la solución concentrada de nitrógeno, se utilizó sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), se pesaron 118g de (NH₄)₂SO₄ y se aforaron a 500ml con agua destilada. De esta solución se agregaron bajo condiciones estériles, en el momento de la formulación de los mostos a los frascos correspondientes, 28 ml de la solución, ofreciendo a cada medio enriquecido con éste compuesto, 2.36 g/L de (NH₄)₂SO₄, correspondiendo a un concentración de 0.5 g/L de nitrógeno.

Como fuente de fósforo se utilizó el fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄). El nivel considerado para las muestras que incluían esta fuente fue de 0.3 g/L de P (es decir 1.32 g de (KH₂PO₄)/ cada litro de medio). Para la solución concentrada, se pesaron 66g de fosfato de potasio monobásico y se aforaron a 500 ml. En cada frasco que llevara adición de fósforo se agregaron 28 ml de la solución concentrada estéril. Ambas soluciones se mantuvieron en refrigeración.

El volumen de trabajo para cada una de las corridas del diseño, fue de 2.8 L, ajustado con agua destilada estéril. Los ensayos se realizaron en frascos de vidrio con capacidad de 3L cada frasco, se inocularon con 20 ml de una suspensión de la respectiva levadura, ajustada a una población de 400 × 10⁶ cel /ml. El tiempo de fermentación fue de 72 h tomando muestras cada 4 horas, para análisis de ARD, pH; riqueza alcohólica y compuestos de NOM 006 SCFI 2005. El volumen final de la fermentación que fue de 2.1L se utilizó para la obtención de muestras de tequila a nivel laboratorio.

2.6 Destilación de las muestras de fermentación

Al volumen final obtenido en la etapa de fermentación se le realizó una doble destilación para tener muestra de tequila.

Para este fin se utilizaron matraces de destilación de 1L, cada carga se realizó con 700 ml del medio final de la fermentación (conocido en la industria con el término de mosto muerto) se destiló a una temperatura de 90°C y se retiraron los primeros 3.0 ml del condensado (fracción referida como “cabezas”). Por cada 700 ml de mosto muerto, se recuperaron 200 ml de ordinario (primera destilación), al ordinario se le determinó la riqueza alcohólica para establecer el volumen a recuperar en la segunda destilación. Los 600 ml de ordinario que se obtuvieron, se destilaron nuevamente a 90°C, retirándose 3.0 ml y se recuperó el volumen de tequila que resultó después de determinar la riqueza alcohólica en los mostos ordinarios, dependiendo de las combinaciones y la concentración de alcohol en el mosto final, se realizaron los cálculos necesarios para tener una riqueza alcohólica no menor de 35% de alcohol en volumen (que es la mínima riqueza permitida en la NOM 006SCFI 2005).

A las muestras de tequila así obtenidas, se analizaron los compuestos de la norma oficial del tequila.

2.7 Optimización

La optimización del proceso se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta, empleando mínimos cuadrados con el paquete estadístico Statgraphics plus 4.0. La función objetivo general que se utilizó fue una de segundo orden, Ec. (1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i,j \\ i < j}} \beta_{i,j} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

donde

Y= Variable de respuesta.

x_i y x_j = Variables independientes.

β_0 = Coeficiente de intersección.

β_i = Coeficiente lineal.

β_{ii} = Coeficiente cuadrático.

β_{ij} = Coeficiente de los productos cruzados.

ε = Error experimental aleatorio.

Se determinó la función objetivo para cada variable de respuesta (Eficiencia, metanol, alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y furfural) y se realizó una optimización de respuesta múltiple tomando en cuenta la función objetivo, maximizando eficiencia con restricciones en metanol y alcoholes superiores principalmente, considerando los niveles máximos de cada uno de éstos parámetros indicados en la normatividad mexicana (NOM 006 SCFI 2005).

Por último se realizó una corrida confirmatoria con las condiciones sugeridas por el modelo, empleando del mismo lote de jugo de *Agave*.

El paquete estadístico utilizado fue el Statgraphics plus 4.0. Los análisis de varianza (ANOVA) realizados en todos los tratamientos se hicieron con un nivel de significancia del 0.05.

2.8 Técnicas analíticas

- 1 Determinación de etanol por densidad DMA (NMX - V - 013-Normex-2005).
- 2 Determinación de azúcares reductores directos (ARD) y totales (ART), método de Fehling, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) NMX-V- 006-Normex-2005.
- 3 Determinación de compuestos de Norma: Aldehídos, Esteres, Metanol; Alcoholes Superiores: Norma Mexicana, NMX-V- 005-Normex-2005 y Furfural: NMX-V- 004-Normex-2005.
- 4 Determinación de fósforo en mostos de *Agave* (AOAC, 1990).
- 5 Determinación de nitrógeno amoniacal en mostos fermentados (método de Nessler. 2800 Spectrophotometer Procedure Manual Hach. 8038 EPA).

3 Resultados y discusión

3.1 Selección de cepas

Los resultados de la selección de las cepas, tanto de la eficiencia de la fermentación alcohólica como de la producción de los compuestos sensoriales de Norma, se presentan en la Tabla 1. La primera columna corresponde a los resultados de la eficiencia (%E), la cepa THL 110 fue la que presentó los valores más bajos, con un valor promedio de 78 %E (± 4). Las

otras tres cepas mostraron valores muy semejantes, con promedio 88 %E (± 4.0), por lo tanto daría lo mismo utilizar la THL 013, 014 ó 018. Sobre los compuestos volátiles regulados en la normatividad mexicana (NOM 006-SCFI-2005), en la misma tabla 1, se puede observar que la cepa THL 018 presentó los valores más bajos respecto a la concentración de metanol (96.46 mg/100ml de alcohol anhidro) y alcoholes superiores (216.09 mg/100ml de alcohol anhidro); sin embargo el análisis de varianza realizado entre las cepas indicó que solamente la biosíntesis de alcoholes superiores fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Como se ha visto en otros trabajos realizados con vinos las cepas aún proviniendo de la misma especie han presentado diferencias respecto a su metabolismo (Shuang y Yan, 2010; Gschaedler y col., 2004; Vilanova y Massneuf-Pomarede, 2005; Rainieri y Pretorius 2000). Otro punto muy importante que se debe considerar en la industria de bebidas alcohólicas es el aspecto sensorial de la bebida, ya que será un factor determinante en la aceptación ó rechazo por parte del consumidor.

Respecto a la evaluación sensorial de la bebida, es importante hacer notar que las calificaciones otorgadas por los jueces al producto evaluado fueron más bajas que cuando se trabaja con el tequila (que es el ordinario rectificado), ya que el ordinario difiere del tequila en la concentración de los componentes mayoritarios que son los compuestos de norma; acetaldehído, acetato de etilo, lactato de etilo, los alcoholes superiores como el isoamílico, isobutílico, n-propanol y el fenetílico, entre otros más y los minoritarios como el eugenol, tymol, hexanoato de etilo, metil furfural, etc. (Escalona y col., 2004; Prado Ramírez, 2004). La concentración de estos productos variará dependiendo si se habla de un ordinario ó un rectificado (tequila).

En la Fig. 1 se presentan los resultados del ANOVA realizado a la preferencia del panel de jueces, por los productos fermentados con las cuatro cepas de levaduras. El único producto que fue estadísticamente diferente (con valor $p < 0.05$), fue el de la cepa THL 014 respecto al proveniente de la cepa THL 018. Entre los productos provenientes de las cepas THL 110; 013 y 018 no se encontraron diferencias significativas. El producto proveniente de la cepa THL 018 fue el que presentó el valor máximo de aceptación (el valor asignado por los jueces fue de 4.8) y el que menos gustó fue el proveniente de la cepa THL 014 (con un valor mínimo de 2.1).

Tabla 1. Generación de compuestos volátiles de norma, por cuatro cepas de *Saccharomyces* sp

Cepas	Eficiencia en fermentación	Aldehídos	Esteres	Metanol	Alc. Sup.	Furfural
	%					
THL 013	88.2589 ^a	20.08 ^a	17.99 ^a	102.51 ^a	321.61 ^a	0.88 ^a
THL 014	88.3966 ^a	25.05 ^a	20.08 ^a	123.75 ^a	339.22 ^a	0.51 ^a
THL 018	87.5164 ^a	25.57 ^a	20.42 ^a	96.46 ^a	216.09 ^b	0.78 ^a
THL 110	77.9316 ^b	24.49 ^a	23.85 ^a	100.93 ^a	319.61 ^a	0.62 ^a
NOM-006-SCFI-2005		0-40	2-270	30-300	20-500	0-1.0

* Letra diferente por columna representa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.5$)

Tabla 2. Valores-P de los factores que intervienen en los diferentes bloques de estudio de la fermentación

Fuente	THL 110 y 100% agave	THL 110 y mosto mixto	THL 018 y e 100% agav	THL 018 y mosto mixto
A: Azúcar	0.232	> 0.2335	0.0069	0.0166
B: Nitrógeno	0.0224	0.1077	0.0055	0.0127
C: Fósforo	> 0.232	> 0.2335	0.0164	> 0.05
D: Temperatura	0.1475	0.046	> 0.05	0.0295
AB (CD)	0.0514	0.1841	0.0061	0.0136
AC (BD)	0.0482	0.1435	0.0049	0.0098
AD (BC)	> 0.232	0.2335	0.0143	0.0493

$p < 0.05$, indica que hay efecto estadísticamente significativo

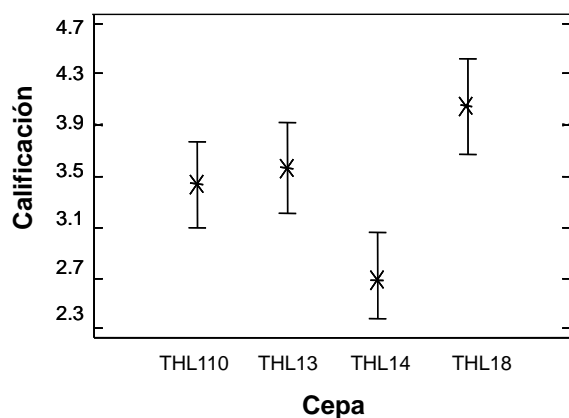


Fig. 1. Resultados de las pruebas hedónicas de los jueces para el producto proveniente de las cuatro cepas.

Con los resultados obtenidos hasta este momento, se decidió trabajar con las cepas THL 018 y la THL 110. La cepa THL 018 porque fue una de las que presentó los resultados más elevados en eficiencia de la fermentación alcohólica (87% E); la única que presentó los valores más bajos de alcoholes superiores (216.09 mg/100 ml de alcohol anhidro) y el producto

(ordinario) obtenido con esta levadura fue el que tuvo la aceptación más alta con los jueces (4.8).

La cepa THL 110 se eligió por presentar los valores de eficiencia más bajos (81.4%); su producción de alcoholes superiores junto con la THL 013 y 014 estuvo dentro de norma (319.61 mg/100 ml de alcohol anhidro) y el producto proveniente de esta cepa también tuvo buena aceptación por el panel de jueces (el valor asignado fue de 4.0).

Con los resultados se ratifica la importancia de seleccionar levaduras locales (Arellano y col., 2008; Vilanova y Massneuf-Pomarede, 2005; Morata y col., 2003); y una vez seleccionadas es importante conocer las necesidades de cada cepa para poderlas manipular de forma favorable en la industria.

3.2 Evaluación de la fermentación

Después de la selección de las cepas de levadura, se trabajaron con dos tipos de mostos para las cepas seleccionadas, dando 4 bloques, como se describieron en la sección de materiales y métodos.

La primer observación realizada en los cuatro bloques fue que tanto el tipo de mosto (mixto y 100% Agave) como la levadura empleada, influyeron

sobre la eficiencia de la fermentación. Los resultados de los valores-P para cada uno de los bloques se presentan en la Tabla 2. La principal diferencia en la composición de los mostos fueron las fuentes de azúcares. La composición en el 100% *Agave*, estuvo constituida básicamente de: inulina (7.93%) y fructosa (82.65%); mientras que los mostos mixtos estuvieron constituidos de: sacarosa (42.42%); y fructosa (50.12%). Siendo la concentración de fructosa, el carbohidrato predominante en ambos mostos.

En aquellos donde se trabajó con mosto mixto se presentaron las eficiencias más altas, obteniéndose valores entre el 90 y 94%, mientras que en los medios con 100% *Agave* los más altos estuvieron entre 80 y 82%, como se ha reportado en otros trabajos realizados con la elaboración de vinos, el medio de fermentación y las cepas de levaduras, especialmente *Saccharomyces* presentaron diferencias en la composición de los constituyentes de los vinos y eficiencias variadas (Shuang y Yan, 2010; Inei y col., 2009; Morata y col., 2003).

En cuanto a la influencia de las interacciones posibles y de los factores sobre la variable de respuesta (%E), la cepa THL 018 presentó mucha similitud en ambos mostos: 100% *Agave* y mixto (Tabla 2), excepto la concentración de fósforo (P) que influyó en el mosto 100% y no en el mixto. La Temperatura (T) mostró influencia en el mosto mixto y no en el 100% *Agave*.

Respecto a la cepa THL 110, no hubo similitud con ningún factor en ambos mostos, sólo fueron estadísticamente significativos en el medio 100% *Agave*, el contenido de nitrógeno (N) y la interacción Azúcar-fósforo (AC); mientras que en el mosto mixto el único factor que influyó fue la Temperatura (T) (Tabla 2).

En los medios 100% *Agave*, los factores que influyeron sobre la eficiencia en ambas cepas fueron N y las interacciones Azúcar (A) - Concentración de fósforo (P), que fueron los únicos factores para la cepa THL 110; mientras que para la cepa THL 018 además de los ya mencionados influyeron Azúcar(A), Concentración de fósforo (P) y las interacciones Azúcar-N y Azúcar-T. En mosto mixto el único factor común en ambas cepas fue T, que fue el único en la cepa THL 110 y para la cepa THL 018 además los factores Azúcar y N las interacciones Azúcar-P, Azúcar-N, Azúcar-T, estos resultados se resumen en la Tabla 2.

La influencia del nitrógeno sobre el medio de fermentación ha sido reportada en varios aspectos del metabolismo de la levadura (Inei y col., 2009;

Bohscheid y col., 2007; Arrizón y col., 2006; Wang y col., 2003; Moreira y col., 2002; Albers y col., 1996; Kolothumannil y col., 1990) Así como la relación fuente de Carbono-Nitrógeno que ha sido reportada como influyente en cepas evaluadas sobre la producción de alcoholes superiores (Bely y col., 2003; Pinal y col., 1997), todos los resultados aquí obtenidos. Así como las interacciones del nitrógeno con otros factores demuestran su importancia en el medio de fermentación.

La adición de Fósforo (P) al medio de fermentación, mostró influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta (%E), en la levadura THL 018 en el mosto 100% *Agave*, (Tabla 2). Sin embargo las interacciones de los otros factores con el fósforo fue determinante y afectó la eficiencia de la fermentación, a excepción de la interacción Nitrógeno-Fósforo en la cepa THL 110 en mosto mixto donde no mostró ser influyente estadísticamente sobre la respuesta evaluada (%E). Esto indica que la adición del fósforo no es necesaria en la formulación de los mostos, ya que éstos tienen una concentración inicial de 0.1 g/L de fósforo como fosfato sugiriendo que esta concentración es suficiente para que la levadura realice el metabolismo. El efecto de la Temperatura (T) no mostró ser importante con la levadura THL 018 en mosto 100% *Agave*, sin embargo la mayoría de las interacciones con este factor influyó en la respuesta (%E). Como lo ha reportado Flores y col. (2005), en estudios sobre vinos, el valor óptimo dependerá de la cepa, algunas a temperaturas muy elevadas pueden romper las enzimas de membrana ocasionando una interrupción de la fermentación. Otros autores reportan la resistencia que presentan algunas cepas a temperaturas de 42°C a 45 °C (Ballesteros y col., 1991, Kar y col., 1985; Kelsall, 2003). Esta resistencia a temperaturas más altas por parte de las dos cepas en el medio 100% *Agave*, puede ser debido a la presencia componentes encontrados en este medio que provienen del *Agave*, como ácidos grasos.

La tolerancia a temperaturas elevadas sea de crecimiento ó fermentación, dependerá de la cepa y de la concentración de alcohol intracelular ya que se produce más rápidamente de lo que puede ser transportado hacia el exterior (Jones y col., 1981); así mismo se habla sobre la alteración de la síntesis de esterol y de ácidos grasos, sobre todo en la etapa de crecimiento, ya que las células de levaduras pueden presentar gran número de mutantes “petit”, que son células que han perdido su capacidad respiratoria, y que presentan un reducido rendimiento

del producto, debido a un requerimiento elevado de mantenimiento (Jones y col., 1981). En el presente trabajo las levaduras se crecieron a 30 °C, que ha sido reportada en trabajos con medio de *Agave* (Arrizón and Gschaedler 2002 y 2007).

3.3 Optimización

Dentro de los compuestos que están regulados por la normatividad mexicana (NOM - 006 - SFCI - 2005), los que generalmente suelen representar un problema para los productores de tequila son la presencia de Metanol (sobre todo para quienes formulan 100% *Agave*) y Alcoholes Superiores. Por tal razón para la etapa de optimización además de estos dos grupos, también se consideró la concentración de ésteres. La presencia de aldehídos y furfural no representaron ningún problema debido a que sus concentraciones en todos los tratamientos cumplieron perfectamente con la normatividad.

Con los resultados previos al estudio, se procedió a optimizar las condiciones de operación para cada uno de los bloques evaluados. Los coeficientes de las funciones objetivo obtenidos para cada bloque se presentan en la Tabla 3. El procedimiento para la optimización multi-respuesta fue siempre considerando la normatividad del tequila

como restricciones, buscando el valor más alto en la eficiencia de la fermentación alcohólica y minimizando la concentración de ésteres; metanol y alcoholes superiores; a excepción del bloque correspondiente a la levadura THL 110 en mosto 100% *Agave*, donde el nivel de metanol se mantuvo en 200 mg/100 ml de alcohol anhidro; se consideró éste valor porque suele ser un valor promedio para el tequila 100% *Agave* y que además cumple perfectamente con la normatividad. La eficiencia se realizó maximizando la función “deseabilidad”, cuyo valor máximo es 1.0, cuando la función de deseabilidad tiene un valor de 0.0, indica que no hay conformidad con el objetivo deseado y cuando la deseabilidad alcanza el valor de 1.0, indica que tiene conformidad total en los cuatro factores optimizados.

También se determinó que la cepa THL 018 presentó los valores más altos de ésteres, debido a la influencia de cada cepa de levadura sobre la biosíntesis de este compuesto (Arellano y col., 2008; Fraile y col., 2000). Además se determinó que el tipo de mosto también influyó, ya que las concentraciones de ésteres más altas, se reportaron en mostos mixtos, como lo reportado por Da Porto (2002), donde sus trabajos también relacionan los mostos de vino, con la variación en el contenido en ésteres dependiendo del tipo de uva empleada.

Tabla 3. Coeficiente de las ecuaciones objetivos para cada respuesta.

Medio	THL 018				THL 110				
	Eficiencia	Metanol	Alc. Sup.	Esteres	Eficiencia	Metanol	Alc. Sup.	Esteres	
100 % agave	b0	4.07	549.282	949.253	73.3918	65.0117	196.079	17.009	-17.5259
	b1	5.27657	0.49619	-16.4839	-4.8681	0.434762	21.4494	54.6311	3.28986
	b2	50.4943	187.789	-444.455	20.665	33.6057	-215.395	-215.785	18.9386
	b3	85.6286	-1339.2	-768.261	-279.074	-39.3738	986.673	798.402	80.6643
	b4	0.401679	0	-6.85987	0.354875	0.0945	-2.49213	5.26075	0.39825
	b5	-3.27429	-53.8286	0	0	-1.98571	0	0	-1.06857
	b6	-6.82857	116.452	65.9357	22.8738	3.42381	-85.7976	-46.8357	-7.01429
	b7	-0.0349286	0	0	0	0	0	-1.23375	-0.007
Mixto	b0	67.4142	245.329	496.749	-66.1125	44.0946	670.745	1264.75	25.15
	b1	1.51476	36.0224	18.1351	5.37095	1.17236	-19.7471	-47.9845	-1.76167
	b2	-69.2229	-411.875	-432.915	44.38	47.4	-298.8	-418.96	131.514
	b3	120.476	1735.71	1042.77	33.9738	65.1393	-1063.42	-1521.56	-154.9
	b4	0.543286	-7.28087	-6.08688	1.77496	-0.132357	-3.4165	-4.72775	0
	b5	4.54286	0	0	0	-2.89	0	0	-5.51429
	b6	-10.4762	-150.931	-90.6757	-4.42381	-5.66429	92.4714	132.31	11.1667
	b7	-0.0312857	0	0	-0.097714	0.0611071	0	0	0

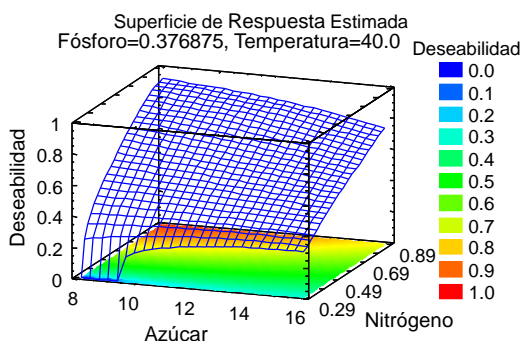


Figura 2 a) THL 110 y Mosto Mixto

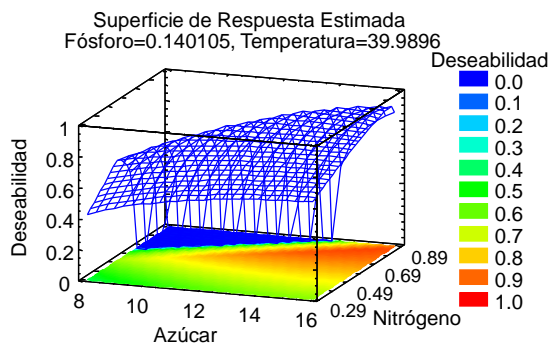


Figura 2 b) THL 110 y Mosto 100% Agave

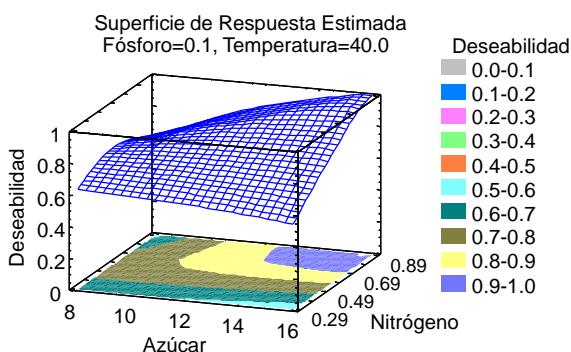


Figura 2 c) THL 118 y Mosto Mixto

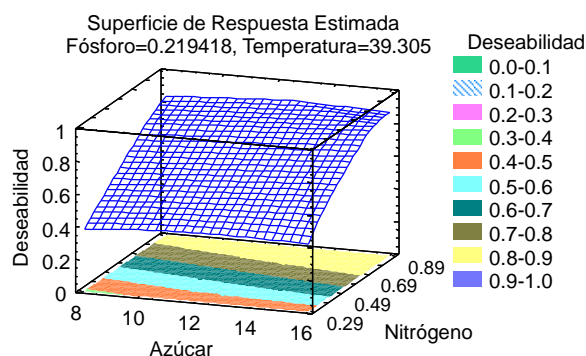


Figura 2 d) THL 118 y Mosto 100% Agave

Fig. 2. Superficie de respuesta estimada para la relación azúcar-nitrógeno con las dos levaduras y los dos tipos de mostos. a) Cepa THL 110 y mosto mixto. b) Cepa THL 110 y mosto 100% agave. c) Cepa THL 018 y mosto mixto. d) Cepa THL 018 y mosto 100% agave.

En la Fig. 2 se presentan las gráficas de superficie de respuesta, con la interacción Azúcar-Nitrógeno. En cada una de ellas se mantiene el fósforo y la temperatura en sus niveles óptimos. Se puede observar la importancia de la presencia de la fuente de nitrógeno, así como el factor temperatura, en todos los casos para obtener los mejores resultados se sugirió trabajarla en los niveles altos. Respecto a la concentración de azúcar, también se sugiere trabajar niveles altos en el medio, a excepción de la cepa THL 110 en mosto mixto, donde se obtienen las mejores respuestas con el nivel bajo (8°Bx).

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la optimización multi-respuesta, así como los valores óptimos para cada uno de los factores a controlar y los valores estimados de cada respuesta en cada uno de los bloques de estudio. Las unidades para los parámetros de metanol; alcoholes superiores y

ésteres están dadas en mg/100 ml de alcohol anhidro. Se puede también observar que la cepa que presenta los mejores resultados en cuanto a eficiencia de la fermentación, es la cepa THL 110.

En el caso de la cepa THL 110 y mosto 100% *Agave*, el programa sugirió trabajar con una concentración de azúcar de 14.6 °Brix; nitrógeno 0.8 g/L; fósforo 0.140105 g/L y a una Temperatura de 39.9896 °C para tener la respuesta máxima en eficiencia de fermentación de 80.3167% respecto a la ecuación teórica máxima.

En el caso de la cepa THL 110 y mosto mixto, que corresponde a la eficiencia más alta bajo las condiciones evaluadas (94.58%), el programa sugirió trabajar con una concentración de azúcar de 8.0 °Brix; nitrógeno 0.797979 g/L; fósforo 0.376875 g/L y a una temperatura de 40 °C (Tabla 4).

Tabla 4. Valores óptimos de acuerdo a las restricciones de la norma NOM006-SCFI-2005.

Medio	Cepa THL 018		Cepa THL 010	
	Deseabilidad óptima = 0.863176		Deseabilidad óptima = 0.926465	
	Azúcar (°Bx)	15.00	Azúcar (°Bx)	14.60
	Nitrógeno (g/L)	0.799994	Nitrógeno (g/L)	0.8
	Fósforo (g/L)	0.219418	Fósforo (g/L)	0.140105
100 %	Temperatura (°C)	39.305	Temperatura (°C)	39.9896
Agave	Respuesta (esperada)	Óptima	Respuesta (esperada)	Óptima
	% Eficiencia	75.8412	% Eficiencia	80.3167
	Metanol*	150.3940	Metanol*	200.002
	Alcoholes Superiores*	127.4420	Alcoholes Superiores*	148.104
	Esteres*	44.8899	Esteres*	41.9685
	Deseabilidad óptima = 0.977732		Deseabilidad óptima = 0.891312	
	Azúcar	15	Azúcar	8.00
	Nitrógeno	0.8000	Nitrógeno	0.797979
	Fósforo	0.1000	Fósforo	0.376875
	Temperatura	40	Temperatura	40.0000
Mixto	Respuesta (esperada)	Óptima	Respuesta (esperada)	Óptima
	% Eficiencia	88.565	% Eficiencia	94.5800
	Metanol*	112.1040	Metanol*	15.6955
	Alcoholes Superiores*	147.2330	Alcoholes Superiores*	182.915
	Esteres*	59.0875	Esteres*	56.0896

*mg/100 ml de alcohol anhidro

**Objetivo: Maximizar eficiencia

Restricciones

$30 \leq f(MeOH) \leq 300$ Minimizar

$20 \leq f(AS) \leq 500$ Minimizar

$2 \leq f(Esteres) \leq 200$ Maximizar

(A excepción de THL 110 y 100 % agave, donde la respuesta de metanol, se mantuvo en 200)

Tabla 5. Resultados estimados con el programa contra los obtenidos en forma experimental

Parámetros	100% Agave			Mosto mixto		
	Estimada	Obtenida	% d	Estimada	Obtenida	% d
% Eficiencia	80.32	80.60	0.35	94.58	91.10	-3.68
Metanol*	200.00	214.12	7.06	15.70	74.63	375.49
Alc. Sup*	148.10	164.13	10.82	182.92	178.53	-2.40
Esteres*	41.97	27.66	-34.10	56.09	39.75	-29.13

*mg /100 ml de alcohol anhidro

Con las condiciones sugeridas por el programa, se realizó una corrida de validación para las eficiencias más altas, tanto para trabajar con mosto mixto (en la producción de tequila) como para cuando se trabajó

con mosto 100% Agave. La levadura que se utilizó en ambos casos fue la cepa THL 110. Los resultados de las cinéticas de fermentación, para la validación de los resultados se presentan en la Fig. 3.

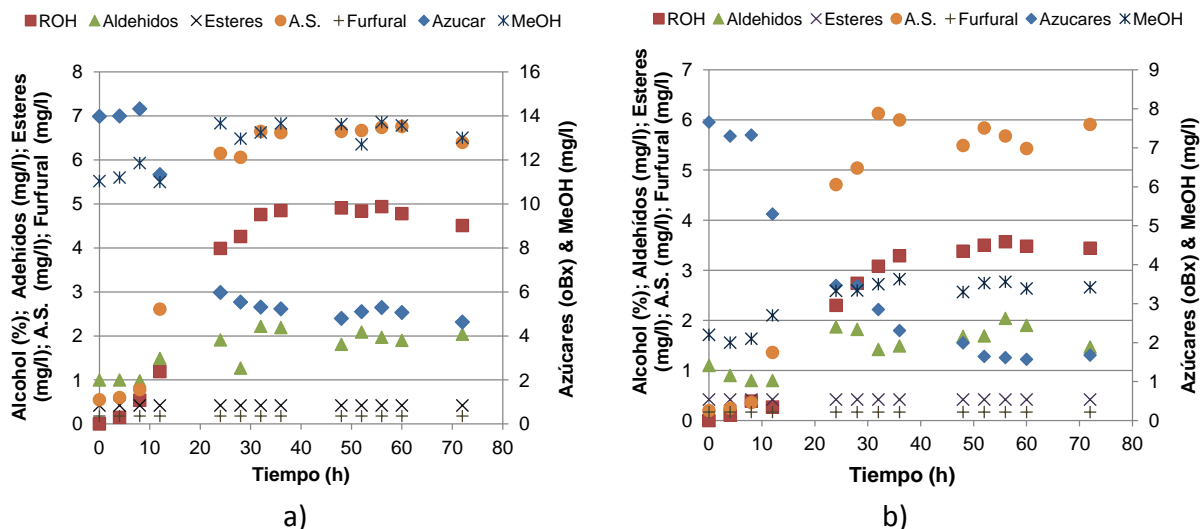


Fig. 3. Biosíntesis de compuestos de Norma (NOM 006-SCFI-2005) a) Cepa THL 110 en medio 100% agave b) Cepa THL 110 en mosto mixto.

Respecto a la producción de los compuestos sensoriales de norma, se puede observar una diferencia significativa del metanol en los mostos 100% *Agave* respecto a los mostos mixtos, una de las principales razones de la presencia de este compuesto en el tequila, radica principalmente en la concentración de *Agave* que se utiliza en la elaboración de la bebida. Como se puede observar las variaciones entre lo predicho y lo validado en forma experimental fueron muy semejantes (Tabla 5).

Conclusión

Las cepas THL 013, THL 014 y THL018, no mostraron una diferencia estadística cuyos valores de eficiencia fueron muy semejantes, con un valor promedio de 88%. Mientras que la cepa THL 110, fue la que presentó el valor más bajo (77.9%) y fue diferente estadísticamente al resto de las cepas.

Las condiciones óptimas para la cepa THL 018 en medio 100% *Agave*: 15°Brix; Nitrógeno, 0.799994 g/L; Fósforo, 0.219418 g/L y una temperatura de 39.305°C. Para mosto mixto: 15°Brix; Nitrógeno, 0.8 g/L Fósforo, 0.1 g/L y una temperatura de 40°C. Para la cepa THL 110 en mosto 100% *Agave*: 14.6°Brix; Nitrógeno, 0.8 g/L Fósforo, 0.140105 g/L y una temperatura de 39.9896°C y finalmente para mosto mixto: 8°Brix; Nitrógeno, 0.797979 g/L Fósforo, 0.376875 g/L y una temperatura de 40°C.

Respecto a la validación del programa los resultados estimados y los obtenidos experimentalmente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que hay una igualdad entre ellos y por consiguiente validando las ecuaciones y valores de optimización.

La cepa THL 110 en la etapa de selección de levaduras fue la que presentó los valores en fermentación más bajos (78% E), sin embargo después de la etapa de optimización fue la cepa de levadura que presentó los valores más altos en ambos medios, en mixto la eficiencia fue de 94.5 (91) % y en 100% *Agave* fue 80.3 (80.6)%. La cepa THL 018, mantuvo su eficiencia con un promedio de 87%. Se logró incrementar la eficiencia con la cepa THL 110 en un 4% en mosto 100% *Agave* y un 17% en mosto mixto.

Agradecimientos

Los autores agradecen todas las facilidades y apoyo técnico del M.C. Miguel Cedeño Cruz y la Dra. Aidedé Orozco, a través de Casa Herradura. De la misma forma se agradece el apoyo económico de CoSDAC.

Nomenclatura

x variables independientes

Y variable de respuesta

Símbolos griegos

β coeficientes de las funciones objetivo

ε error

Referencias

- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C. y Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae*. Anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3187 - 3195.
- Arellano, M., Pelayo, C., Ramírez, J. y Rodríguez, I. (2008). Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from *Agave* juice. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 35, 835-841.
- Arrizón, J., Fiorce, C., Acosta, G., Romano, P. y Gschaedler, A. (2006). Fermentation behaviour and volatile compound production by *Agave* and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 181-189.
- Arrizón, J. y Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 965-970.
- Arrizón, J. y Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1123-1131.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabañas, A., Carrasco, J., Martín, M., Negro, J., Saez, F. y Saez, R. (1991). Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28, 307-332.
- Bely, M., Rinaldi, A. y Doubourdieu, D. (2003). Influence on assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 507-512.
- Blateyron, L. y Sablayrolles J.M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 184-189.
- Bohlscheid, J.C., Fellman, J.K., Wang, X.D., Ansen, D. y Edwards, C.G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions in the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 102, 390-400.
- Da Porto, C. (2002). Volatile composition of "grappa low wines" using different methods and conditions of storage on an industrial scale. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 395-402.
- Escalona, H.B., Villanueva, S.J., López, J.E., González, R.M., Martín del Campo, T., Estarrón, M., Cosío, R. y Cantor, E. (2004). Calidad del tequila como producto terminado: normatividad. Composición volátil y la imagen sensorial. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas* (CIATEJ ed.) Pp. 174-256.
- Flores, N., Martínez, R.A., Fernández, E., Gallegos, J.L., Díaz, M.I. y Vázquez S.R. (2005). Características fisicoquímicas en vinos tintos: Método tradicional y maceración carbónica empleando dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 289-297.
- Fraile, P., Garrido, J. y Ancín, C. (2000). Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rosé wines. Evolution during fermentation. *Journal of Agricultural of Food Chemistry* 48, 1789-1798.
- Gschaedler, A., Ramírez, J., Díaz, D.M., Herrera, J.E., Arellano, M., Arrizón, J. y Pinal, L. (2004). Fermentación, etapa clave en la elaboración del tequila, En *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas* (CIATEJ ed.) Pp. 63-120.
- Inei, G., Velasco, H.A., Gutiérrez, G.F. y Hernández, H. (2009). Statistical approach to optimization of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of VALFOR® 100 zeolite NAA. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 265-270.
- Jones, R.P., Pamment, N. y Greenfield, P.F. (1981). Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry* 16, 42-49.

- Kar, R. y Laxmikanthrao, V. (1985). Ethanolic fermentation by thermotolerant yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 35B, 235-239.
- Kelsall, D.R. y Lyons, P.T. (2003). Practical management of yeast: conversion of sugars to ethanol. En: *The Alcohol Textbook 4th Edition*. (Jackes, K.A., Lyons, P.T. y Kelsall, D.R ed.). Pp. 121-133.
- Kolothumannil, C.T. e Ingledew, M. (1990). Fuel alcohol production: Effect of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 2046-2050.
- Lachance, M.A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 151-160.
- Melero, R. (1992). Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32, 371 - 379.
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. y Cocolin, L. (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4884 - 4893.
- Molina, J.A., Botello, J.E., Estrada, A., Navarrete, J.L, Jiménez, H., Cárdenas, M. y Rico, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6, 41-50.
- Morata, A., Gómez, M.C., Colombo, B. y Suárez J. A. (2003). Piruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B, formation in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7402-7409.
- Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., De Pinho, P.G., Hogg, T. y Vasconcelos, I. (2002). Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta* 458, 157-167.
- Munoz, E. e Ingledew, W. M. (1989). Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: Importance of the lipid component. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1560-1564.
- Norma Mexicana, NMX-V-013-NORMEX - 2005. Bebidas alcohólicas. Determinación del contenido alcohólico (% alcohol en volumen a 293 K, 20°C). Método de ensayo (prueba), 2005.
- Norma Mexicana, NMX-V-005 NORMEX-2005. Bebidas alcohólicas. Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores. Método de ensayo (prueba), 2005.
- Norma Mexicana. NMX-V-006 NORMEX-2005. Determinación de azúcares reductores directos y totales (Inulina, glucosa, fructosa y sacarosa) método por cromatografía de líquidos de alta resolución. En: Bebidas alcohólicas. Determinación de Azúcares Reductores Directos y Totales. Método de ensayo (prueba), 2005.
- Norma Oficial Mexicana, (NOM) 006-SCFI-2005. Bebidas Alcohólicas-Tequila especificaciones. Secofi. Diario Oficial de la Federación 6 de enero de 2006.
- Pinal, L., Cedeño, M., Gutiérrez, H. y Álvarez, J. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters* 19, 45-47.
- Prado, R.R. (2004). Destilación. En *Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas* (CIATEJ Ed.), 123-169.
- Rainieri, S. y Pretorius I.S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50, 15-31.
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 953-958.
- Shuang, C. y Yan, X. (2010). The influence of yeast strain on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine. *Journal of the Institute of Brewing* 116, 190-196.
- Torija, M.J., Beltrán, G, Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón J.M. y Mas A. (2003). Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology* 20, 255-258.

- Torrea, G.D. y Ancín, A. C. (2002). Nitrogen metabolism in Chardonnay musts inoculated with killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94, 15-22.
- Walker, G.M. (2000). Yeast cytology. En: *Yeast Physiology and Biotechnology*. (John Wiley & Sons) Cap. 2, pp. 11-42.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J.C. y Edwards, C.G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349-359.