



CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL A PARTIR DE JUGO DE *Agave cupreata* EN LA ELABORACIÓN DE MEZCAL

FERMENTATIVE CHARACTERIZATION OF PRODUCERS ETHANOL YEAST FROM *Agave cupreata* JUICE IN MEZCAL ELABORATION

E. Pérez^{1,2,3}, J.C. González-Hernández^{1*}, M.C. Chávez-Parga³ y C. Cortés-Penagos²

¹Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico # 1500, Colonia Lomas de Santiaguito, C. P. 58120, Morelia, Michoacán, México.

²Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

³Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Recibido 17 de Marzo 2013; Aceptado 1 de Mayo 2013

Resumen

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales son capaces de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales, con distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. En el presente trabajo se estudió el comportamiento cinético de biomasa y etanol nivel matraz y nivel biorreactor durante la fermentación alcohólica. Se utilizó jugo de *Agave cupreata* y se establecieron como variables de estudio: tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, a nivel matraz (Diseño Box-Behnken). En biorreactor, se estudió la aireación y agitación (Diseño factorial). Las variables de respuesta evaluadas en cada ensayo fueron el crecimiento celular; la cantidad producida de etanol; el consumo de azúcares y el pH. Ya destilado el producto, se procedió a realizar la identificación de compuestos volátiles (metanol, etanol y alcoholes superiores) por cromatografía de gases. Se encontró que la interacción concentración de azúcares-temperatura fue la variable con mayor influencia sobre el incremento en el porcentaje de etanol. La cepa de *Kluyveromyces marxianus* presentó el mayor rendimiento de etanol (12.46 % v/v), en concentraciones de azúcares de 12 °Brix y una temperatura de 28 °C, y a nivel biorreactor, con agitación de 150 rpm y aireación de 0.1 vvm. El destilado presentó una concentración de metanol y etanol de 1.89 % y 47.75 % respectivamente.

Palabras clave: cepa de levadura, *Agave cupreata*, diseño experimental, fermentación alcohólica.

Abstract

Conventional and unconventional yeast strains possess the ability to produce ethanol under different operating and nutritional conditions showing different yields in biomass and ethanol production. In the present work, the kinetics of biomass and ethanol productions were studied at flask and bioreactor levels during the fermentation of *Agave cupreata* juice. The established variables in a Box-Behnken design were: type of yeast, sugars concentration and temperature (at flask level). At bioreactor level, aeration and agitation were studied by using a factorial experimental design. The response variables evaluated in each test were biomass, ethanol and pH. Volatiles compounds (methanol, ethanol and higher alcohols) were quantified in the distilled fermented must by gas chromatography. It was found that the temperature-sugars interaction was the most significant factor influencing the ethanol concentration. *Kluyveromyces marxianus* yielded the highest ethanol concentration (12.46% v/v) at 12 °Brix and 28 °C, in bioreactor level, with agitation of 150 rpm and aeration of 0.1 vvm. The fermented must was distilled containing methanol and ethanol concentrations of 1.89% and 47.75% respectively.

Keywords: yeast strain, *Agave cupreata*, experimental design, alcoholic fermentation.

*Corresponding author. E-mail: jcgh1974@yahoo.com
Tel. (+52-443) 3121570. Ext. 231., Fax (+52-443) 3121570. Ext. 231.

1 Introducción

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son clave en la vinificación, ya que son los responsables de la fermentación alcohólica, la principal reacción en la conversión del mosto en vino (Torija, 2002).

Las fermentaciones espontáneas son aquellas que se producen de forma natural, sin necesidad de un inóculo. En el caso del tequila y del mezcal, las fermentaciones son realizadas por las levaduras provenientes de la planta (*Agave*) y del ambiente dentro de la industria de producción. Esto hace que estas fermentaciones no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación; siendo importante estudiar la dinámica poblacional propia de las fermentaciones. (Kunkee y Amerine, 1970; Ribéreau y col., 1975; Lafon, 1983; Zambonelli, 1988).

En la producción de vinos, los géneros mayoritarios en la fermentación son *Hanseniaspora*/*Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia* (Querol y col., 1990; Longo y col., 1991; Fleet y Heard, 1993; Schutz y Gafner, 1994). Posteriormente estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como *Saccharomyces* (Ribéreau, 1985).

Estudios realizados por Fleet y col. (1984) y por Heard y Fleet (1986) han demostrado que algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, ya que sobreviven más de lo que inicialmente se suponía, pudiendo alcanzar crecimientos significativos que influyen en la composición organoléptica de las bebidas alcohólicas. Estas levaduras no-*Saccharomyces* son particularmente importantes, ya que sintetizan una gran variedad de compuestos volátiles que contribuyen de manera determinante al bouquet de la bebida (Díaz y col., 2008). Estas levaduras no convencionales proliferan en la primera etapa de la fermentación, siendo su población drásticamente reducida, debido a una supuesta intolerancia al etanol (Kunkee, 1984) y/o a

una limitación nutricional (Valle, 2009). Estos tipos de levaduras tienen rendimientos de entre 25 a 49 g/L de etanol y pueden llegar a producir concentraciones de etanol incluso semejantes a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando se les cultive en un medio apropiado que satisfaga sus necesidades nutricionales para su óptimo desarrollo y eficiencia fermentativa (Díaz-Montaño y col., 2011; Díaz-Montaño y col., 2012). Además, las modificaciones que producen en la composición del mosto, tendrán un efecto en el metabolismo de *Saccharomyces*. La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presentes en el mosto depende de varios factores como son la localización geográfica, las condiciones climáticas; así como, la variedad y madurez del *Agave*.

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila y mezcal), son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no volátiles, cuya mezcla compleja define sus atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor (López, 1999; Vallejo y González, 1999; Cole y Noble, 2003). Se han identificado componentes en el mezcal que por su naturaleza química se clasifican en acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos, siendo los grupos más abundantes en componentes y concentraciones, los alcoholes, ésteres y ácidos orgánicos (Botello y col., 2006). En el mezcal, hay compuestos volátiles (aromáticos) en concentraciones relativamente altas; principalmente, metanol y alcoholes superiores (Lanchenmeier y col., 2006; De León y col., 2006) que son tóxicos, por lo que sus concentraciones están reguladas por las normas oficiales mexicanas. Además, contienen compuestos volátiles en concentraciones bajas, como son los ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, furanos y terpenos (López, 1999; López y Guevara, 2001; De León y col., 2006), que contribuyen al aroma del mezcal y otro compuesto más, que es el furfural, indicador para comprobar que la bebida se obtuvo a partir de *Agave* como materia prima (Gallardo y col., 2008). Los compuestos volátiles tienen diferente origen; por un lado, pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas del cultivo; y por otra parte, pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante el añejamiento de la bebida (Cole y Noble, 2003).

2 Materiales y métodos

2.1 Levaduras

Se utilizaron tres cepas de levaduras aisladas de fermentos espontáneos de una región productora de mezcal, caracterizadas molecularmente mediante la técnica RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), las cuales fueron: Lev1 (*Saccharomyces cerevisiae*), Lev8 (*Kluyveromyces marxianus*) y Lev9 (*Kluyveromyces marxianus*, var. *Drosophilarum*) (Damián y col., 2012).

2.2 Fuente de sustrato

Se utilizó como sustrato jugo de *A. cupreata*, de un mismo lote de cultivo, con una edad de madurez promedio de 8 años, con origen de Etúcuaro, Michoacán, el cual fue previamente cocido, filtrado y congelado para su posterior uso.

2.3 Planteamiento de diseño experimental, matraz

Para evaluar los factores y los niveles de operación con el objetivo de maximizar la producción de etanol en la elaboración de mezcal se establecieron como variables A: Tipo de levadura (Lev1, Lev8 y Lev9), B: Sustrato (10, 12 y 14 °Brix) utilizando el extracto de jugo de *A. cupreata* y C: Temperatura (25, 30 y 35 °C), variables controlables en el proceso de fermentación llevado a cabo en las vinatas de la región. Se establecieron 3 niveles para cada factor experimental, los cuales fueron establecidos con base en estudios previos. Seleccionadas las variables y los niveles de operación se construyó un esquema experimental tipo Box-Behnken.

2.4 Planteamiento de diseño experimental, biorreactor

Para evaluar las variables y los niveles de operación con el objetivo de maximizar la producción de etanol para fines industriales se establecieron las variables A: aireación (0.1 y 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio)) y B: Agitación (50 y 150 rpm), con 2 niveles para cada factor. Se inoculó con la cepa seleccionada por su capacidad fermentativa, empleando el medio con mayor rendimiento alcohólico. Las fermentaciones se llevaron a cabo en un fermentador tipo tanque agitado (Applikon system®). Seleccionadas las variables y

sus niveles, se construyó un esquema experimental factorial (2^{2^2}) replicado y con dos puntos centrales. En todos los ensayos experimentales se mantuvo constante la concentración inicial del inóculo, el volumen del medio de cultivo y el pH. Tanto los diseños experimentales como el análisis estadístico se realizaron mediante los software STATGRAPHICS Plus® y Minitab®, para interpretar los resultados de cada experimento de manera estadística.

2.5 Formulación del inóculo

Para la formulación del inóculo se colocaron 100 ml de jugo de *Agave* previamente hidrolizado y filtrado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml; se ajustó la concentración de azúcares a 12 ° Brix empleando un refractómetro de ABBE; con una concentración del 1 % en sales de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y se ajustó el pH a 5. El medio fue esterilizado. Los matraces fueron inoculados al agregar 2 asadas de colonias de la cepa a estudiar cultivadas en cajas de Petri. Los matraces fueron incubados a 28° C durante 48 h, con una agitación de 150 rpm.

2.6 Formulación de los medios de cultivo de los diferentes tratamientos

El jugo del *Agave* hidrolizado fue sometido a filtración, se le ajustó la concentración de azúcares como sólidos solubles por refractometría en la escala °Brix, mediante un refractómetro de ABBE adicionando agua destilada, se agregó $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ en 1 g/L y se ajustó el pH a 5 (González-Hernández y col., 2012). Esto se llevó a cabo, bajo las condiciones formuladas en el diseño experimental respectivamente para cada matraz. Finalmente, se colocaron 100 ml de medio formulado en matraces Erlenmeyer de 250 ml y se esterilizaron durante 20 min a 15 lb/in a 121 °C. Los matraces fueron inoculados con 3×10^6 cel/mL.

2.7 Determinación del número de células

Esta determinación se realizó por conteo de células en la cámara de Neubauer (Loptik, Labor).

2.8 Cuantificación de azúcares reductores

Para llevar a cabo dicha metodología, se colocaron en un tubo de ensaye (con tapón de rosca), 100 μL de la muestra diluida convenientemente, 100 μL de reactivo DNS, se tapó el tubo, se agitó y se colocó por 5 min en un baño a 95-100 °C. Se dejó enfriar

en un baño de hielo y se agregó 1 mL de agua destilada; finalmente, se leyó la densidad óptica de la muestra a 540 nm en un espectrofotómetro (UNICO model 1000). Para calcular la concentración de azúcares reductores totales, fue necesario construir una curva de calibración con xilosa, fructosa y glucosa, respectivamente.

2.9 Cuantificación de etanol

Se colocaron en una celda de plástico con tapa, 2 ml de agua destilada, 0.10 mL de la muestra, 0.20 mL de solución tampón pirofosfato, 0.2 mL de solución de NAD⁺ y 0.02 mL de solución de aldehído deshidrogenasa. Se colocó en otra celda la misma cantidad de reactivos a excepción de la muestra. Se mezclaron y se leyó la absorbencia de ambas celdas (340 nm), transcurridos 2 minutos (A_1). Se agregaron a cada celda 0.02 mL de la solución de alcohol deshidrogenasa y se leyó la absorbencia después de 5 minutos de incubación (A_2). Se procedió a realizar los cálculos pertinentes para la obtención de la concentración de etanol presente en cada muestra (Procedimiento de ensayo K-ETOH 11/05, Megazyme).

2.10 Medición de pH

El pH, se midió en las muestras mediante un potenciómetro (Hanna instruments).

2.11 Desarrollo de las fermentaciones en biorreactor

Obtenidas las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de etanol por el diseño a nivel matraz; así como, la cepa con el mayor rendimiento de biomasa y etanol, se procedió a realizar el diseño factorial (2^2) en un biorreactor tipo tanque agitado (Applikon), evaluando como variables de respuesta, el crecimiento celular y la producción de etanol. El pH fue monitoreado en forma continua con un sensor y controló en 5.0 ± 0.2 unidades por la adición de NaOH 1N, empleando un controlador ADI 1030 (Applikon Instruments®) y bomba peristáltica (Marter Flex pump drive). La temperatura se controló en 28 ± 0.5 °C mediante un termocirculador de inmersión (PolyScience 7306AAIB) y la velocidad de aireación se mantuvo constante entre 0.1-1(vvm) mediante un rotámetro (Cole Parmer). La velocidad de agitación fue controlada por medio de un controlador P100 (ADI 1032 Applikon®) y para la determinación de

la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, se utilizó un sensor con membranas de titanio (CRODE).

2.12 Destilación del mosto fermentado

Se realizó una destilación fraccionada del mosto fermentado en el biorreactor mediante un rotavapor Heidolph (Hei-VAP Advantage) en un baño de agua a una temperatura de 78 °C, durante 30 minutos a 150 rpm, para obtener el mezcal y se procedió a realizar una rectificación del producto destilado bajo las mismas condiciones de operación.

2.13 Identificación de compuestos volátiles

El mezcal obtenido por destilación fue analizado mediante un cromatógrafo de gases (Varian), para lo cual se tomaron muestras de 1 μ L del mezcal y de los estándares de metanol, etanol, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico y ácido acético, los cuales se inyectaron en el cromatógrafo de gases, montando un método para su identificación. Las separaciones se llevaron a cabo utilizando una columna capilar de 50 m \times 0.32 mm de diámetro interno. Se utilizó nitrógeno de ultra alta pureza, como gas portador, con una presión constante de 10 psi y un flujo de 1.5 mL/min.

3 Resultados y discusión

3.1 Variables de operación

Se establecieron como variables de respuesta, el crecimiento celular y el rendimiento de etanol, ya que se pretendía maximizar la obtención de este metabolito en la producción de mezcal. Fue importante también conocer el comportamiento cinético de cada cepa por lo cual se consideró como variable de respuesta el crecimiento celular. La Tabla 1 muestra la matriz del diseño de segundo orden Box-Behnken además de los resultados experimentales obtenidos de crecimiento celular y producción de etanol para cada ensayo.

Al observar los resultados obtenidos en cada una de los tratamientos, se puede notar que no todas las combinaciones probadas dieron como resultado la misma cantidad de células y etanol, siendo el tratamiento No.8 (*K. marxianus* var. *Drosophilarum*, 14 °Brix y 30 °C) el que presentó la mayor cantidad celular producida: 3.58×10^8 cel/mL y el No.9 (*K. marxianus* var. *Drosophilarum*, 12 °Brix y 25 °C) por el porcentaje de etanol producido: 12.45 % v/v.

Tabla 1. Diseño experimental Box-Behnken.

Ensayo	Levadura	Sustrato (°Brix)	Temperatura (°C)	Células (Millones)	Etanol (% v/v)
1	+1	0	+1	164	11.6
2	0	+1	+1	164	4.08
3	0	0	0	203	11.67
4	0	+1	-1	144	11.7
5	0	-1	+1	132	10.97
6	-1	-1	0	297	7.60
7	+1	-1	0	266	9.51
8	-1	+1	0	358	8.12
9	+1	0	-1	156	12.45
10	+1	+1	0	293	8.93
11	0	0	0	140	11.42
12	-1	0	+1	293	7.20
13	0	-1	-1	129	7.19
14	0	0	0	129	11.7
15	-1	0	-1	274	10.09

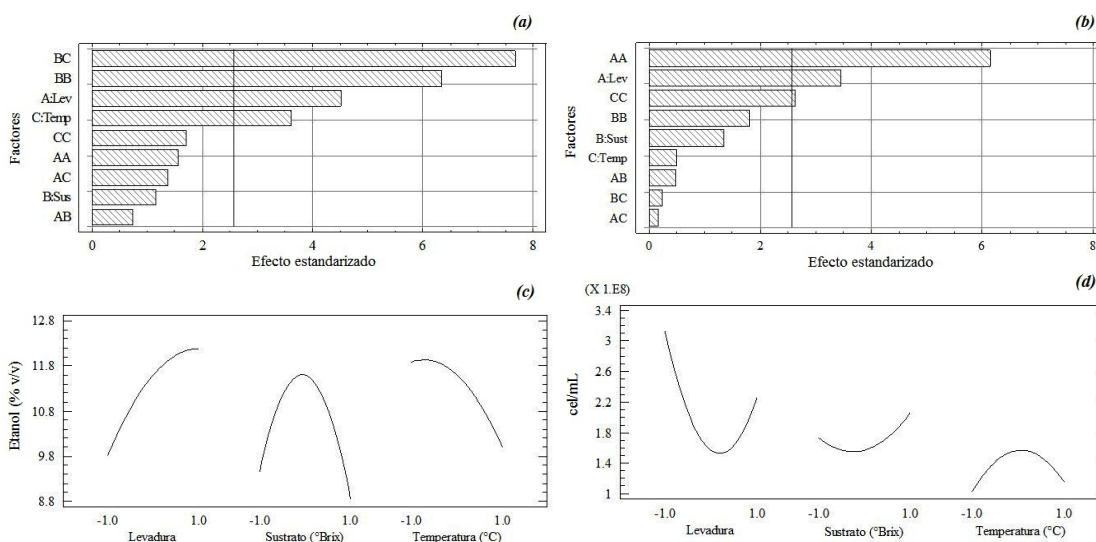


Fig. 1. Diagrama estandarizado de Pareto para (a) Etanol producido y (b) Crecimiento celular. Efectos de los factores experimentales determinados para (c) Etanol, (d) Crecimiento celular.

Este valor de producción de etanol fue comparable al reportado por Carbó y col. (2008), quienes reportaron una producción de 12 a 13 % entre las 24-48 h de fermentación de vinos utilizando cultivos mixtos de *Brettanomyces/Dekkera* y *S. cerevisiae*.

3.2 Análisis del diseño experimental Box-Behnken (a nivel matraz)

Una forma de identificar la influencia de los factores experimentales sobre la variable de respuesta es

mediante los diagramas de Pareto y de los efectos principales obtenidos (Fig. 1).

En ellos se observa que para la producción de biomasa el factor con mayor influencia fue la cepa de levadura. En cuanto a la producción de etanol se observa que el factor con mayor influencia fue el sustrato. Todos aquellos factores que sobrepasaron la línea del punto crítico en los diagramas de Pareto, son considerados significativos para el proceso.

Los efectos anteriormente descritos se visualizan mejor en las curvas de superficie de respuesta (Fig. 2a

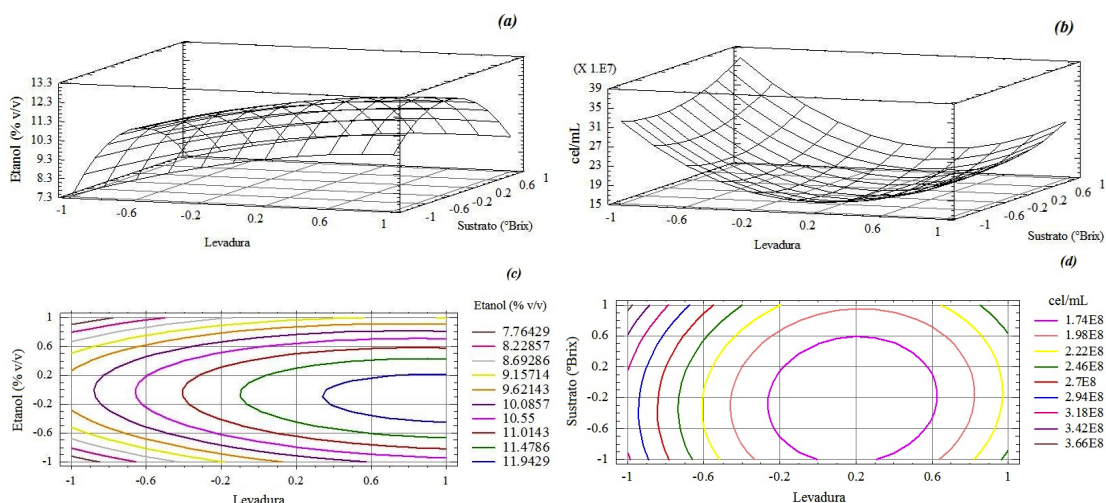


Fig. 2. Gráficas y contornos de superficie de respuesta para (a) Etanol producido y (b) Crecimiento celular, contra concentración de azúcares (10, 12 y 14 °Brix) y género de cepa (*K. marxianus*, var. *Drosophilum*, *S. cerevisiae* y *K. marxianus*).

Tabla 2. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para producción de etanol, F: prueba de Fisher, P: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia.

Factor	Suma de cuadrados	g. l.	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-P
A:Levadura	11.2339	1	11.2339	20.34	0.0063
B:Sustrato	0.7442	1	0.7442	1.35	0.2981
C:Temperatura	7.18205	1	7.18205	13.00	0.0154
AA	1.34404	1	1.34404	2.43	0.1795
AB	0.3025	1	0.3025	0.55	0.4925
AC	1.0404	1	1.0404	1.88	0.2283
BB	22.2234	1	22.2234	40.24	0.0014
BC	32.49	1	32.49	58.83	0.0006
CC	1.60026	1.60026	2.90	0.1495	
Total error	2.76152	5	0.552303		
Total (corr.)	79.3392	14			

y 2b). En ellas podemos observar que, la producción de biomasa es mayor cuando utilizamos la levadura *S. cerevisiae* (-1) y al aproximarnos a concentraciones de azúcares altas (14 °Brix), aunque este no es un factor con gran significancia en el crecimiento celular. González-Hernández y col. (2012), también reportaron que a concentraciones iniciales de 14 °Brix con jugo de *A. cupreata*, el crecimiento celular de *S. cerevisiae* aumentaba en comparación con los tratamientos ajustados a 10 °Brix. Se observa también que para obtener mayores concentraciones de etanol, el proceso debe aproximarse hacia concentraciones de azúcares de 12 °Brix, utilizando *K. Marxianus* y 28°C (Fig. 2b). La concentración de azúcares durante el cultivo de esta cepa, disminuyó desde 109.5 (10 °Brix)

hasta 9.01 g/L. Díaz-Montaña y col. (2011) obtuvieron valores similares con *Kloeckera africana* y jugo de *A. tequilana*, reportando un consumo de azúcares de 105.32 g/L. Finalmente el pH varió de un pH inicial de 5 hasta uno final de 3.6.

La Tabla 2 muestra el análisis de varianza del proceso, analizando como variable de respuesta la cantidad de etanol producido, se observa que tanto la cepa de levadura, la temperatura, la interacción sustrato-sustrato (BB) y la interacción sustrato-temperatura (BC), son factores experimentales significativos para el proceso ($P > 0.05$). La Tabla 2 también muestra qué factores no son significativos, por lo cual es conveniente eliminarlos del proceso o ampliar su rango experimental para optimizarlo.

Tabla 3. Resultados experimentales de las variables de respuesta del diseño factorial (2^2).

Ensayo	Agitación	Aireación	Células (Millones)	Etanol (%v/v)
1	-1	1	221	11.76
2	-1	-1	234	15.06
3	0	0	254	10.63
4	1	-1	230	13.27
5	1	1	219	14.94
6	-1	1	249	11.87
7	-1	-1	177	14.77
8	0	0	198	10.58
9	1	-1	199	15.09
10	1	1	261	14.88

El análisis estadístico muestra una R^2 de 96.52 %, lo que representa que estos valores significativos explican el 96.52 % del proceso.

3.3 Análisis del diseño experimental factorial 2^2 (nivel biorreactor)

Una vez concluido el diseño Box-Behnken se procedió a determinar un criterio de escalamiento para desarrollar el siguiente diseño experimental factorial nivel biorreactor, utilizando condiciones de 12° Brix, 28 °C y la cepa de *K. marxianus*, valores óptimos obtenidos del análisis del diseño Box-Behnken de segundo orden. Se establecieron como variables experimentales, A: aireación (0.1-1 vvm (volumen de aire por volumen de medio)) y B: Agitación (50-150 rpm). La aireación y el mezclado según Galindo y col., (2008), son las operaciones más importantes que se buscan satisfacer en el fermentador, pues una proporciona oxígeno al cultivo (en procesos aerobios) y el otro mantiene la homogeneidad en los parámetros fisicoquímicos. Los experimentos fueron realizados en un biorreactor marca Applikon de 3 L de capacidad, equipado con controladores de velocidad de agitación, pH, oxígeno y temperatura.

La Tabla 3 muestra la matriz de ensayos del diseño factorial con réplicas y dos puntos centrales. Se muestran también los valores máximos obtenidos en cada ensayo, observándose mayor crecimiento celular en el ensayo 10 (2.61×10^8 cel/mL) y mayor producción de etanol en los ensayos 2 y 9 (15.06 y 15.09 % v/v respectivamente).

Santiago y col. (2009), obtuvieron concentraciones de 4.2×10^7 a 9.8×10^7 cel/mL a las 54 h de fermentación utilizando jugo de *Agave potatorum* y 1.6×10^7 a 2.5×10^7 cel/mL con *Agave angustifolia*.

Sin embargo, son concentraciones bajas comparadas con las reportadas en el caso de las fermentaciones espontáneas del tequila, donde la población alcanza valores de 6 a 15×10^7 cel/mL (Cedeño, 1995) o en condiciones controladas donde se alcanzan 2×10^7 cel/mL (Arrizon y Gschedler, 2006; Arrizon y Gschedler, 2002).

En el análisis de varianza obtenido en la Tabla 4 se aprecia que los valores obtenidos de valor-p son mayores a $\alpha = 0.05$, por lo que se acepta la hipótesis nula (ningún factor es significativo en cuanto a la variable de respuesta). Al observar el coeficiente de determinación (R^2) se concluye que el análisis sólo logra explicar el 39.6 % del proceso (variabilidad del proceso), porcentaje no significativo para considerar utilizar este análisis de varianza, ya que los factores experimentales sólo explican estos porcentajes del proceso, en cuanto a la variable de respuesta.

Este diseño no aportó suficientes resultados útiles que permitieran mejorar el proceso de fermentación a nivel biorreactor, pero los gráficos de efectos principales (Fig. 3) permitieron obtener datos que sugieren la posibilidad de aumentar la agitación pero no la aireación si se quiere obtener mayores rendimientos de etanol. Se observó además un aumento en la producción de etanol a nivel biorreactor de aproximadamente 15.09 % en comparación con el diseño a nivel matraz, en el que se obtuvo una cantidad de etanol de aproximadamente 12.45 %.

Estos gráficos fueron útiles, ya que el análisis de esta primera etapa experimental sugiere desplazar la región experimental en una dirección adecuada, o bien explorar en forma más detallada la región experimental inicial, lo cual puede ser posible si se utiliza la metodología de superficie de respuesta como una segunda alternativa de experimentación.

3.4 Identificación de compuestos volátiles

Finalmente se destiló el mosto fermentado (1,790 mL) mediante un rotavapor Heidolph (Hei-VAP Advantage), obteniendo 70 mL de mezcal con 45 % de alcoholes, determinados mediante un alcoholímetro (Brannan) y se identificaron los estándares y tiempos de retención de etanol, metanol, alcohol isoamílico, alcohol iso-butílico y ácido acético, así como el cromatograma de la muestra de mezcal, mediante cromatografía de gases (Fig. 4). Se obtuvieron seis picos intensos en el cromatograma de la muestra mezcal, que posteriormente fueron identificados mediante su comparación con estándares.

Tabla 4. Análisis de varianza del modelo del diseño factorial para Etanol, F: prueba de Fisher, p: prueba de significancia. *0,05 nivel de significancia.

Factor	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	Relación-F	Valor-p
A:Agitación	2.6001	1	2.6001	0.66	0.4530
B:Aireación	2.6232	1	2.6232	0.67	0.4512
AB	6.872	4	1.718	1.75	0.2434
Bloques	0.0008	1	0.0008	0.00	0.9892
Error Total	19.6626	5	3.9325		
Total (corr.)		9			

$$R^2 = 39.6689$$

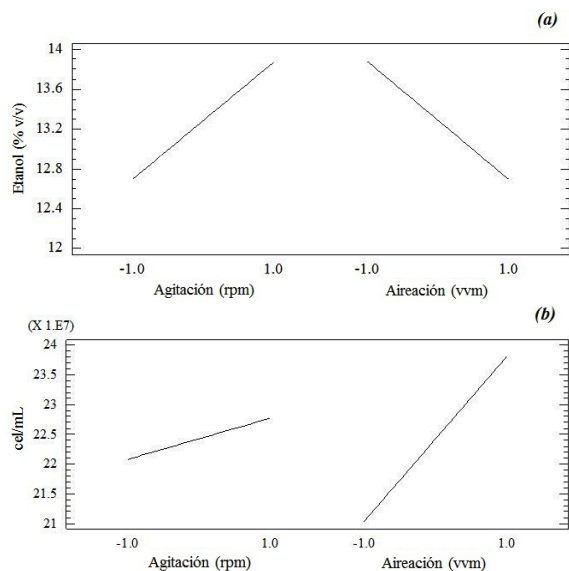


Fig. 3. Gráficos de efectos principales para (a) Etanol, (b) Crecimiento celular, contra género de cepa (*K. marxianus*, var. *Drosophilarum*, *S. cerevisiae* y *K. marxianus*), concentración de azúcares (10, 12 y 14 °Brix) y temperatura (25, 30 y 35 °C).

La Figura 4 nos representa la magnitud real de los picos de los compuestos con mayor concentración en el mezcal y sus tiempos de retención.

Botello y col. (2006) reportaron que las familias de compuestos con mayor presencia en los mezcales analizados son los alcoholes, los ésteres y los ácidos orgánicos. Los autores reportaron concentraciones de cetonas de 1.187 %, ésteres de 17.512 %, alcoholes de 63.54 %, ácidos de 7.685 %, aldehídos de 0.055 %, furanos de 1.930 %, terpenoides de 1.043 %, fenoles de 0.528 % y acetales de 6.511 %.

3.5 Concentración de etanol y metanol

Para la cuantificación de metanol y etanol, se construyó una curva patrón con las áreas de los

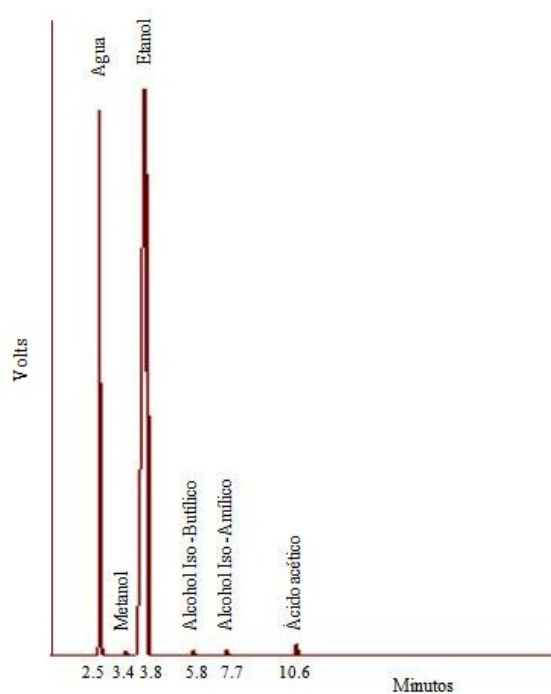


Fig. 4. Cromatogramas del mezcal destilado del mosto fermentado.

cromatogramas de las distintas concentraciones de metanol (2-18 %) y etanol (2-50 %).

Se encontró una concentración de metanol de 1.89 % en la muestra de mezcal. La concentración de metanol puede variar de acuerdo con la especie de *Agave*. Vera y col. (2009), reportaron que utilizando jugo de *A. angustifolia* en la producción de mezcal, obtenían mayores concentraciones de metanol que utilizando *A. potatorum*, diferencia que se atribuyó a la especie de *Agave*. Es probable que ello se deba a la desmetilación de pectinas de los *Agaves* por efecto de las temperaturas altas y del pH ácido (Téllez, 1998).

Se encontró una concentración de etanol de 46.75 % en la muestra destilada de mezcal. Valores similares a los reportados por Díaz-Montaña y col. (2012), con

una concentración de etanol de 30-45 %, utilizando *A. tequilana* y cepas de levadura *K. africana*.

Ambas concentraciones de metanol y etanol se encuentran dentro de las especificaciones establecidas para la bebida (NOM-070-SCFI-1994).

Conclusiones

Mediante la metodología de superficie de respuesta a nivel matraz, fue posible encontrar condiciones de cultivo que mejorarán la producción de etanol durante la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal (concentraciones de azúcares entre 10 a 12 °Brix y temperaturas entre 25 a 30°C, encontrándose un óptimo rendimiento de etanol (0.97 g g^{-1}) con la cepa *K. marxianus*, en 12 °Brix de concentración inicial de azúcares y 28 °C. Estos valores fueron considerados para realizar el diseño factorial a nivel biorreactor. La cepa de *K. marxianus* presentó la mayor producción de etanol, (12.46% v/v). Esta cepa junto con *K. marxianus*, var. *Drosophilum* presentaron un crecimiento similar, 3.84×10^8 y 3.8×10^8 cel/mL, respectivamente, siendo mayores al de *S. cerevisiae* de 2.03×10^8 cel/mL.

El crecimiento celular fue similar en todos los ensayos del diseño Factorial 2^{2^2} nivel biorreactor, mostrando que los tratamientos no fueron significativos para la variable de respuesta (% de etanol); sin embargo, en un tratamiento (ensayo 10) presentó el mayor crecimiento celular, de 2.61×10^8 cel/mL. Se observó también (Tabla 3) que los ensayos 2, 5 y 9 presentaron las mayores producciones de etanol (15.06, 14.94 y 15.09 % v/v, respectivamente). Se determinó que los mejores rendimientos de etanol ocurren con una agitación de 150 rpm y una aireación de 0.1 vvm. Finalmente, se identificaron en el producto destilado (mezcal) al etanol, metanol, alcohol isoamílico, alcohol isobutílico y ácido acético, mediante cromatografía de gases, cuantificando el metanol y etanol de 1.89 y 46.75%, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de las especificaciones de la norma que regula la bebida.

Referencias

Arrizon, 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.

Arrizon, J. y Gschaedler, A. (2006). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology* 102, 1123-1131.

Botello, A. J. E., Cárdenas, M. M., Estrada, B. A., Molina, G. J. A., Jiménez, I. H., Navarrete, B. J. L., y Rico, M. M. (2006). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6, 41-50.

Carbó, R., Ginovart, M. y Vias, M. (2008). Influencia de *Brettanomyces/Dekkera* en la evolución de la fermentación alcohólica. Presentación. 5-7 de noviembre. Barcelona, España: *II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria, V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*.

Cedeño, C. M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15, 1-11.

Cole, V. C. y Noble, A. C. (2003). Flavor chemistry. In: *Fermented Beverage Production*. (Kluwer Academic/Plenum Publishers), Pp. 393-396. New York.

Damián, R. R. M., Álvarez, J. L., Chávez, P. M. C., González-Hernández, J. C. y Ortiz, L. F. (2012). *Aislamiento, caracterización molecular y bioquímica del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica en la producción de mezcal en Michoacán*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

De León, R. A., González, H. L., Barba de la Rosa, A. P., Escalante, M. P. y López, M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1337-1341.

Díaz-Montaño, D. M., Délia M.L., Estarrón, E. M. y Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *International peer-reviewed Journal Enzyme and Microbial Technology* 4, 608-616.

Díaz-Montaño, D. M., Córdova-López, J. A. y Valle, Rodríguez, J. O. (2011). Efecto interactivo de

- las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en la fermentación de jugo de *Agave* con *Kloeckera africana*: Presentación. 21-26 Junio, Acapulco Guerrero, México: *XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1993). Yeast growth during fermentation, In: *Wine Microbiology and Biotechnology*, (Ed. G.H. Fleet) Pp. 27-54. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied Environmental Microbiology* 48, 1034-1038.
- Gallardo, V. J., Gschaedler, M. A. C., Cházaro, B. M., Tapia, C. E., Villanueva, R. S., Salado, P. J. H., Villegas, G. E., Medina, N. R., Aguirre, O. M. y Vallejo, P. M. (2008). *La producción de mezcal en el estado de Michoacán*. Gobierno del Estado de Michoacán y Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco. Michoacán, México.
- Galindo E., Peña C. y Serrano C. L. (2008). Domesticar microorganismos en un biorreactor: Los retos del bioingeniero. *Una ventana al quehacer científico*. Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México. Pp. 131-144.
- Galindo F. E. (2008). *Aspectos de ingeniería en fermentaciones: como mezclar gases, líquidos y sólidos*. México. 1-5.
- González-Hernández, J. C., Pérez, H. E., Damián, R. R. M. y Chávez, P. M. C. (2012). Isolation, molecular and fermentative characterization during mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 389-400.
- Heard, G. M. y Fleet, G. H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technology in Australia* 38, 22-25
- Kunkee, R. E. y Amerine, M. (1970). Yeasts in winemaking. In: *The Yeasts Technology*, Vol. 3. (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison), Pp. 5-72. Academic Press, London.
- Kunkee, D. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, Vol. 1. Department of Viticulture and Enology, University of California. Pp. 1:315-332.
- Lachenmeier, D. W., Sohnius, E. M. y López, M. G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican *Agave* spirits (tequila, mescal, stool and bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3911-3915.
- Lafon, L. S. (1983). Wine and brandy. In: *Biotechnology*, Vol 5: Food and Feed Production with Microorganisms. (Eds. H.J. Rehm y G. Reed) Pp. 81-163. Verlag, Chemie, Weinheim.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T.G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42, 141-144.
- López, M. C. (1999). Tequila Aroma. In: *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. F. Shahidi, Ch Ho (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Pp. 211-217.
- López, M. G. y Guevara, Y. (2001). Authenticity of three Mexican alcoholic beverages by SPME-GCMS. *Annual Meeting of Institute of Food Technologists*. New Orleans, L. A. 10-3.
- Querol, A., Jiménez, M. y Huerta, T. (1990). A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science* 55, 114-122.
- Ribéreau, G. J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. y Sudraud, P. (1975) *Sciences et Techniques du Vin*, vol. 2. Dunod, Paris.
- Ribéreau, G. P. (1985). New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture* 36, 1-10.
- Santiago, G. P. A., López, M. G. y Vera, G. A. M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 32, 273-279.

- Schütz, M. y Gafner, J. (1994). Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters and Applied Microbiology* 19, 253-257.
- Téllez, P. (1998). El cocimiento una etapa importante en la producción de tequila. *Bebidas Mexicanas* 7, 19-20.
- Torija, M. M. J. (2002). *Ecología de levaduras: Selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Tesis de Doctorado en Bioquímica, Universidad Pública de Tarragona, España.
- Valle, R. J.O., Hernández-Cortés, G., Córdova J.A., Estarrón, E. M. y Díaz-Montaño, D. (2012). Fermentation of *Agave tequilana* juice by *Kloeckera africana*: influence of amino-acid supplementations. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 195-204.
- Vallejo, C. y González C. (1999). Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas Mexicanas* 8, 1-17.
- Vera, G. A. M., Santiago, G. P. A. y López, M. G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave Angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnica Mexicana* 32, 273-279.
- Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*. *Edagricole*, Bologna, Italy.