

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**EVALUACIÓN DE FERMENTACIONES DE MOSTOS DE DASYLIRION SPP
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS INOCULADOS CON CEPAS DE
LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y EVALUACIÓN DE LAS
CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS CONGENÉRICOS.**

POR:

Q.B.P. SALMA SARAHI ÁVILA HERNÁNDEZ

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

AGOSTO DE 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

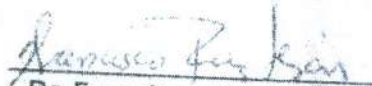
Chihuahua, Chih., 25 de Agosto del 2019
195/SIP/2019

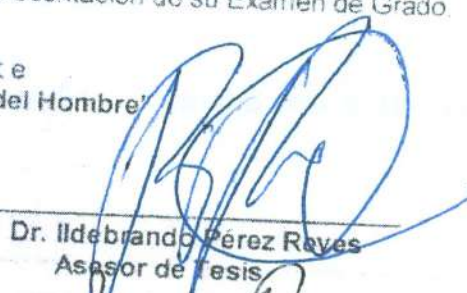
Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente:

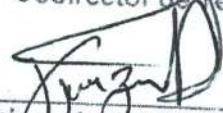
Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la Tesis intitulada **Evaluación de fermentaciones de mostos de Dasyliirion spp bajo condiciones controladas inoculados con cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas y evaluación de las cinéticas de producción de compuestos congénicos**. Presentada por la Q.B.P. Salma Sarahí Ávila Hernández alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos

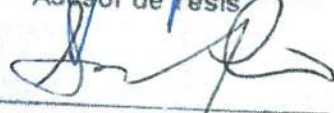
Después de la revisión, indicamos al Tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

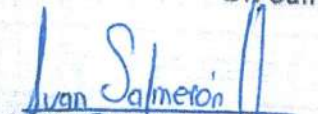
Atentamente
"Por la Ciencia para Bien del Hombre"

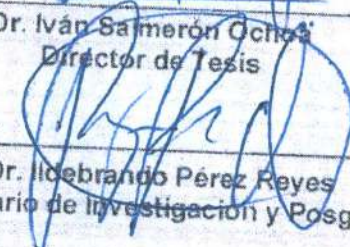

Dr. Francisco Ruiz Terán
Codirector de Tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Asesor de Tesis


Dr. Francisco Javier Zavala Díaz de la Serna
Asesor de Tesis


Dr. Samuel Bernardo Pérez Vega
Asesor de Tesis


Dr. Ivan Salmerón Ochoa
Director de Tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

Chihuahua Chih. 12 julio, 2019

Dr. Jaime Adame Gallegos
Coordinador Académico de Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Presente.-

A través de la presente en mi carácter de Director de la tesis "**Evaluación de fermentaciones de mostos de *Dasyliirion spp* bajo condiciones controladas inoculados con cepas de levaduras y bacterias ácido lácticas y evaluación de las cinéticas de producción de compuestos congenéricos**", de la estudiante de la Maestría en Ciencias en Ciencia y Tecnología de Alimentos **Salma Sarahí Ávila Hernández**. Hago la notificación que la tesis ha sido liberada por mi parte y la considero apropiada para que sea evaluada por el comité de revisores.

Desde ya muy agradecido por el tiempo concedido y reciba mis más sinceros saludos.

ATENTAMENTE



Dr. Iván Salmerón Ochoa
CA-71 Procesos Alternativos
en Ingeniería de Biosistemas
Facultad de Ciencias Químicas

Director de Tesis

C.c.p. Dr. Ildebrando Pérez Reyes.- Secretaria de Investigación y Posgrado

DEDICATORIA

Dedico los frutos de éste trabajo a mi hijo Paulo a quien amo con toda mi alma, que me provoca un esfuerzo de convertirme en una mejor persona, que es la luz en mi camino cuando siento que me encuentro en obscuridad y por el cual despierto con el propósito de ampliar nuestros horizontes, esperando que con esto se mantenga en el sendero del bien tocando vidas con mucho amor y pasión. El día que tengas la capacidad de leer y entender este documento deseo que sientas la inspiración de tu presencia en mi vida y que recuerdes todas las enseñanzas que con todo mi amor y corazón te he regalado, que tengas presente que los límites los quitamos y ponemos nosotros mismos, y si he sembrado en ti la semilla del amor por la ciencia y el trabajo y te conviertes en una persona feliz y plena habré cumplido uno de mis propósitos de vida.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia a dios y el universo que ha permitido mi permanencia en en ésta vida con salud y mucha resiliencia.

A Conacyt por brindarme beca, el cual ha sido un gran apoyo durante mi desarrollo como maestro en ciencias, que bajo el proyecto CB-2015-01-25843 ha provisto los recursos necesarios para que pudiese desarrollar mi investigación, así como crear nuevos vínculos de colaboración en el extranjero.

A mi alma mater por recibirme luego de cinco años de estar fuera de sus instalaciones y brindarme la confianza y el apoyo, así como el honor de representarlos.

A mi madre Amelia, hermanos Martin y Liliana que siempre ha estado a mi lado, y en especial a mi papá, quien siempre me respalda y aconseja, sin el cual no habría llegado tan lejos como hasta el momento he llegado, al que admiro y respeto, y del cual espero seguir aprendiendo para convertirme en un ser tan sabio como él.

A mi padre académico Dr. Iván Salmerón, quien sin conocerme depositó en mi éste hermoso trabajo, así como el doctor Samuel Pérez , que siempre me cobijaron y guiaron en este difícil proceso de aciertos y desaciertos que comprende la investigación, y que sin esta oportunidad no hubiese tenido la fortuna de conocer a personas maravillosas, que me hizo sentir que pertenezco a una segunda familia, con la que convivimos en ocasiones más tiempo y experiencias, dejan en mi un sentimiento de aprecio y cariño hacia ustedes.

Al doctor Zavala por compartirme su conocimiento y técnicas.

A Alma y a Jaime, mis amigos de generación, con quienes tuve la fortuna de aventurarnos y conocer Inglaterra, quienes me escucharon y compartieron momentos hermosos y personales, ha sido un placer coincidir con ustedes en esto.

A Erika y a Ada quienes en estos dos años se han convertido en mis mejores amigas, mis cómplices , siempre teniendo una sonrisa y una palabra de aliento, muchos consejos y momentos compartidos, paulo y yo las llevamos en nuestro corazón, y sabemos que serán

muchos años más los que podamos estar para ustedes, a los chicos nuevos pero igual de apreciados, Marina, Karla, Saúl y Melissa, por esos coffee break y platicas de laboratorio que nos unen, me siento afortunada de haber formado parte del CA-71 que a parte de ser un cuerpo académico somos un gran equipo, estoy convencida que mi sitio era con ustedes.



ABREVIATURAS

°Brix

°C

μL

Ka

Kb

BAL

g/L

G-C

GM-MS

Hs

Kg

mg/L

min

mL

mm

PDMS/DVB

pH

ppm

Rpm

S/d

SPME

h

%P/v

Grados Brix

Grados centígrados

Micro litros

Kluyveromyces spp. (a)

Kluyveromyces spp. (b)

Bacterias ácido lácticas

Gramos sobre litros

Cromatografía de gases

Cromatografía de gases acoplado a un detector de masa

Head space

Kilogramos

Miligramos sobre litros

Minutos

Mililitros

Milímetros

Polimetilsilixano/divinilbenceno

Potencial de hidrógeno

Partes por millón

Revoluciones por minuto

Sin determinar

Microextracción en fase sólida

Horas

Peso/peso

Peso/volumen

1 Resumen

En este trabajo se caracterizó fisicoquímicamente la planta *Dasyllirion spp.* con el objetivo de conocer el porcentaje de azúcares aprovechables para el proceso de fermentación, el contenido de carbohidratos corresponde a 15.22%, y 44.75% de fibra en la piña cruda lo cual es un indicativo de azúcares aprovechables contenidos en el material lignocelulósico, conteniendo 160.19 g/L de azúcares totales y 57.12 g/L de azúcares reductores y un °Brix de 15 en el jugo . En la etapa de fermentación en medio sintético fructosado se evaluó la capacidad de producción de etanol a dos condiciones de agitación (0 y 150 rpm) a 30 °C durante 6 días de seis cepas de levaduras aisladas a diferentes tiempos de la fermentación de mostos de Sotol , éstas pertenecientes a los géneros : *Pichia spp.* (2 cepas, a y b), *Kluyveromyces spp.* (2 cepas, a y b), *Torulaspora spp.* y *Naganishia spp.*, se demostró que la agitación no ofrece un efecto significativo en la producción de etanol, y se determinó que *Torulaspora spp.*, produce mayor cantidad de etanol (1.73 g/L), seguida de *Kluyveromyces spp.* (a) (1.39 g/L). La fermentación de mosto de *Dasyllirion spp.* se llevó a cabo con las dos cepas de *Kluyveromyces spp.*, demostrando que la cepa a, tiene una mayor capacidad de metabolizar los azúcares reductores consumiendo un 71.2% de los azúcares reductores en el medio contra un 26.6% de la cepa b, así como una producción de etanol de 2.35 g/L contra 0.259 g/L respectivamente, por lo cual la fermentación final se realizó con un cultivo mixto de *Kluyveromyces spp.* (a) /BAL, reduciendo la producción de etanol a 1.42 g/L (un 39.5% menos que el cultivo puro). En el análisis de compuestos volátiles en mosto previo a fermentación como los fermentados con cultivos puros de *Kluyveromyces spp.* se detectaron en promedio de 30 compuestos volátiles , de los cuales los mayoritarios fueron ácidos, seguidos por alcoholes superiores, aldehídos y cetonas. Sin embargo en el mosto fermentado con cultivo mixto se reduce en un 87% la cantidad de volátiles presentes. El presente estudio demuestra que los cultivos puros no tienen una buena capacidad de producción de etanol, y el cultivo mixto afecta la producción de etanol y volátiles, por lo cual no son candidatas a usarse como inóculo para la producción de sotol por si solas. Como parte del trabajo de éste proyecto se

realizó una estancia en UCL en Londres dirigido por el Dr. Michael Sulu, dicho reporte se encuentra en el anexo VI

Abstract

In this work *Dasyilirion spp.* plant was characterized. The main objective was to know the sugars content available for the fermentation process, the carbohydrate content corresponds to 15.22%, and 44.75% of fiber in raw pineapple, which is an indicative of available sugars contained in the lignocellulosic material, containing 160.19 g / L of total sugars and 57.12 g / L of reducing sugars and a Brix of 15 in the juice. In the fermentation stage in fructose synthetic medium, the ethanol production capacity was evaluated at two stirring conditions (0 and 150 rpm) at 30 ° C for 6 days of six yeast isolated strains of Sotol musts, those belong to the genera: *Pichia spp.* (2), *Kluyveromyces spp.* (2 strains, a and b), *Torulaspora spp.* and *Naganishia spp.*, it was demonstrated that the agitation does not offer a significant effect in the production of ethanol, and it was determined that *Torulaspora spp.*, produces greater amount of ethanol (1.73 g / L), then *Kluyveromyces spp.* (a) (1.39 g / L). The fermentation of *Dasyilirion spp.* must was carried out with the two strains of *Kluyveromyces spp.*, Showing that strain a has a greater capacity to metabolize reducing sugars consuming 71.2% of reducing sugars in the medium against 26.6% of strain b, as well as an ethanol production of 2.35 g / L and 0.259 g / L respectively, so that the final fermentation was carried out with a mixed culture of *Kluyveromyces spp.* (a) / BAL, reducing the production of ethanol to 1.42 g / L (39.5% less than the pure culture). The analysis of volatile compounds in must before fermentation, such as ferments with *Kluyveromyces spp.* Had shown a media of 30 detected volatile compounds, which acids were the major proportion, then superior alcohols, aldehydes and ketones. However, in the mixed fermented must, the amount of volatiles present is reduced by 87%. The present study demonstrates that pure cultures do not have good ethanol production capacity, and the culture mixes are also produced in ethanol and



volatile production, so they are not candidates to be used as inoculum for Sotol production alone. As part of this project a stay work was realized in UCL in London , it can be find in attached VI.

Contenido

1	Resumen.....	2
2	Introducción	10
3	Antecedentes	11
3.1	Trabajos realizados en sotol	12
3.2	Bebidas alcohólicas destiladas de agave.....	14
	Tequila	15
	Bacanora.....	15
	Mezcal.....	15
3.3	<i>Dasytirion spp</i>	16
3.4	Proceso de producción.....	17
3.5	Fermentación	18
	Fermentación alcohólica.	19
3.6	Levaduras involucradas en procesos de fermentación de mostos	20
	<i>Pichia spp.</i>	20
	<i>Kluveromyces spp</i>	20
	<i>Saccharomyces spp</i>	21
	<i>Torulaspora spp</i>	21
	Bacterias ácido lácticas.....	22
3.7	Compuestos volátiles presentes en un destilado	23
	Alcoholes	23
	Ésteres.....	23
	Compuestos carbonílicos.....	24
	Ácidos grasos	24
	Compuestos fenólicos.....	24
	Compuestos azufrados	24
4	Justificación	25
5	Hipótesis	25
6	Objetivos	25
6.1	General	25
6.2	Específicos.....	25



7	Materiales y métodos	26
7.1	Materiales y equipo utilizados:	26
7.2	Procesamiento de la materia prima.....	27
7.3	Evaluación de producción de etanol de levaduras	28
7.4		28
7.5	Preparación de material y cepas a utilizar.....	28
	Preparación del medio sintético	29
	Preparación del preinóculo y fermentación de medio sintético	29
	Fermentación de mosto de Dasyllirion spp.	30
	Fermentación Kluyveromyces spp. y bacterias ácido lácticas	31
7.6	Análisis de datos	31
7.7	Técnicas aplicadas.....	31
	Densidad óptica	31
	Evolución de pH.....	32
	Viabilidad celular	32
	Determinación de consumo de azúcares reductores	32
	Determinación de producción de etanol por Head Space	33
	Análisis de mostos mediante técnica Head Space-SPME	35
8	Resultados y discusión	35
8.1	Caracterización de Dasyllirion spp.	36
	Composición fisicoquímica de Dasyllirion spp.	36
8.2	Fermentación fase de screening	37
	Evolución de pH.....	37
	Densidad óptica	38
	Unidades formadoras de colonia (UFC).....	39
	Consumo de Fructosa.....	41
	Concentración de etanol	42
8.3	Análisis de datos	44
8.4	Comparación entre cepas de Pichia spp. y Kluyveromyces spp.	45
	Pichia spp.	45
	Kluyveromyces spp.....	50
8.5	Fermentación de mosto de Dasyllirion spp. con Kluyveromyces spp. Cepa a y b.57	



8.6	Fermentación <i>Kluyveromyces</i> spp. (a) y BAL	63
8.7	Análisis de compuestos volátiles en mostos de <i>Dasylium</i> spp.	67
9	Conclusiones	80
10	Bibliografía	81
11	Anexos	90
11.1	Anexo I	90
11.2	Anexo II curva de calibración para calcular azúcares totales	90
11.3	Anexo III Curva de calibración para la detección de etanol, y romatograma con estándar interno de butanol	91
11.4	Anexo IV . Picos de etanol y butanol respectivamente	92
11.5	Anexo V Análisis estadístico fase screening	93
11.6	Anexo VI Análisis estadístico para cepas de <i>Kluyveromyces</i> spp.	96
11.7	Anexo VII Catabolismo de compuestos aromáticos en condiciones anoxigenicas.	98
11.8	Anexo VIII Proyecto de estancia internacional, colaboración con UCL(Londres).	98

Índice de tablas, figuras e ilustraciones

Figura 1.	Evolución de pH a 150 rpm	38
Figura 2.	Evolución de pH sin agitación	38
Figura 3.	Evolución de densidad óptica a 150 rpm	39
Figura 4.	Evolución de densidad óptica sin agitación	39
Figura 5.	Viabilidad celular a 150 rpm.	40
Figura 6.	Viabilidad celular a 0 rpm	41
Figura 7.	. Evolución del consumo de fructosa a 150 rpm	42
Figura 8.	Evolución del consumo de fructosa sin agitación	42
Figura 9.	Producción de etanol a 150 rpm los días 4-6	43
Figura 10.	Producción de etanol sin agitación los días 4-6	43
Figura 11.	Evolución de pH <i>Kluyveromyces</i> spp. (a)	45
Figura 12.	Evolución de pH <i>Kluyveromyces</i> spp. (b)	46
Figura 13.	Evolución de densidad óptica de <i>Pichia</i> spp. (a)	47
Figura 14.	Viabilidad celular <i>Pichia</i> spp. (a)	48
Figura 15.	Viabilidad celular <i>Pichia</i> spp. (b)	48
Figura 16.	Evolución del consumo de fructosa por <i>Pichia</i> spp. (a)	49

Figura 17. Evolución del consumo de fructosa por <i>Pichia</i> spp. (b).....	49
Figura 18. Producción de etanol por <i>Pichia</i> spp. (a).....	50
Figura 19. Producción de etanol por <i>Pichia</i> spp. (b).....	50
Figura 20. Evolución del pH de <i>Kluyveromyces</i> spp. (a)	51
Figura 21. Evolución del pH de <i>Kluyveromyces</i> spp. (b)	52
Figura 22. evolución de la densidad óptica de <i>Kluyveromyces</i> spp. (a)	53
Figura 23. Evolución de la densidad óptica de <i>Kluyveromyces</i> spp. (b).....	53
Figura 24. Viabilidad celular <i>Kluyveromyces</i> spp (a).....	54
Figura 25. Consumo de fructosa <i>kluyveromyces</i> spp. (a)	55
Figura 26. Consumo de fructosa <i>Kluyveromyces</i> spp. (b).....	55
Figura 27. Producción de etanol <i>Kluyveromyces</i> spp. (a)	56
Figura 28. Producción de etanol <i>Kluyveromyces</i> spp. (b)	56
Figura 29. Evolución del pH	58
Figura 30. Viabilidad celular.	59
Figura 31. Sólidos disueltos en la fermentación	60
Figura 32. Consumo de AR en la fermentación.....	61
Figura 33. Producción de etanol producidas por especies de <i>Kluyveromyces</i> spp.	62
Figura 34. Evolución de pH	64
Figura 35. Viabilidad celular	64
Figura 36. Sólidos disueltos a través de la fermentación	65
Figura 37. Consumo de AR a través de la fermentación	66
Figura 38. Producción de etanol.....	66
Figura 39. Volátiles detectados por HS-SPME en mosto sin fermentar	67
Figura 40. Cromatograma de HS-SPME con <i>Kluyveromyces</i> spp.(a)	70
Figura 41. Cromatograma HS-SPME por <i>Kluyveromyces</i> spp. (b).....	72
Figura 42. Cromatograma HS-SPME por <i>Kluyveromyces</i> spp. (a)/BAL.....	74
Figura 43. . Curva de calibración para azúcares reductores	90
Figura 44. Curva de calibración azúcares totales.....	91
Figura 45. Curva de calibración para azúcares totales	91
Figura 46. Plantilla Excel para determinar ecuación de la recta de concentración de etanol y otros metabolitos. En verde están indicadas las concentraciones de los estándares y en rojo los valores que se utilizan para graficar.....	92
Figura 47. Cromatograma etanol y butanol	92
Figura 48. Tolueno en círculo rojo. Tomado de Carmona, M., Zamorro, MT, Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, JF, Valderrama, JA, ... y Díaz, E. (2009). Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos: una visión genética y genómica. Microbiol. Mol. Biol.....	98

Ecuación 1.....	35
-----------------	----

Ilustración 1. Velo oxidativo generado por la levadura en el medio de fermentación.	43
--	----

Tabla 1. Rampa de temperatura para determinación de etanol.	34
Tabla 2. Condiciones para análisis de mosto por SPME.....	35
Tabla 3. Características iniciales de las piñas de <i>Dasyllirion spp.</i>	36
Tabla 4 Composición fisicoquímica de <i>Dasyllirion spp.</i> previo cocción.....	37
Tabla 5. ANOVA UFC <i>Kluyveromyces a y b</i>	59
Tabla 6. Prueba de Tukey para UFC.....	59
Tabla 7. ANOVA de azúcares reductores de <i>Kluyveromyces a y b</i>	61
Tabla 8. Prueba de Tukey de azúcares reductores.....	61
Tabla 9. Prueba de Tukey para producción de etanol de cepas	63
Tabla 10. Volátiles detectados en mosto previo a fermentación por técnica Head-Space-SPME.....	67
Tabla 11. Volátiles detectados en mosto fermentado por <i>Kluyveromyces spp. (a)</i>	70
Tabla 12. Compuestos detectados en mosto fermentado por <i>Kluyveromyces spp. (b)</i>	73
Tabla 13. Volátiles detectados en mosto fermentado por <i>Kluyveromyces spp. (a)/BAL</i>	74
Tabla 14. Clasificación de volátiles detectados	75
Tabla 15. ANOVA de pH	96
Tabla 16. Prueba de Tukey para pH	96
Tabla 17. ANOVA de sólidos disueltos expresados en °Brix.....	97
Tabla 18. Prueba de Tukey para medias de sólidos disueltos	97

2 Introducción

Las bebidas alcohólicas han sido a través de la historia uno de los elementos de un conjunto de rasgos que caracteriza a una cultura, se les otorgaba un estatus de espiritualidad principalmente, y se desarrollaban en un ambiente muy íntimo de convivencia. Hoy en día siguen formando parte de la cultura e historia de los diferentes grupos poblacionales dependiendo de la región. En México las bebidas que aportan un sello de identidad son el tequila, el mezcal, el bacanora, y el sotol. Siendo éste último en recibir denominación de origen en el año 2002 bajo la norma NOM-159-SCFI-2004.

Aunque la denominación de origen en la norma es para los estados de Coahuila, Chihuahua y Durango, únicamente el estado de Coahuila le ha dado un mayor seguimiento a investigación y desarrollo de los factores que comprenden la producción y sustentabilidad del sotol, es considerado un producto no tradicional, lo cual significa que es poco conocido, su producción generalmente no es masiva y que aunque no figuran en las exportaciones, juega un papel importante en el ingreso rural a nivel regional. A pesar de la existencia de un consejo mexicano de sotol, es poco el seguimiento sobre las derramas económicas en el año del 2005, y 2009. En el 2005 el crecimiento de la industria del sotol generó ingreso por ventas de alrededor de 19.5 millones pesos, en el 2008, se registraron 58.2 millones de pesos producto de esta industria, lo cual, representa un incremento de más del 300% en tres años, las marcas registradas pasaron de 4 a 11, del 2004 al 2009 en el año 2005 (CMS, 2009). Un mercado tan potencial e importante para el estado requiere de una calidad constante y distintiva, si bien la norma fija procesos, procedimientos, características y análisis fisicoquímicos, sigue siendo fabricado en su mayor porcentaje de manera artesanal (mediante procesos espontáneos y naturales), lo que conduce a un producto final con características organolépticas variables, lo cual es una oportunidad de mejora sumamente potencial para respaldar el prestigio tanto a nivel estatal, nacional e internacional, ya que en función de ese prestigio, se encuentra la derrama económica que fortalece la industria y la economía local.

3 Antecedentes

A lo largo del siglo XX se fortaleció una cultura de libertad que permitió la convivencia de ideologías y doctrinas de gran diversidad. Por añadidura, esas acciones acababan por infringir la propia moral produciendo resquebrajaduras que se han profundizado en México en los últimos años, lo que desvirtúa logros culturales realizados a lo largo del siglo XX. Por lo que es de gran importancia fortalecer la adhesión de los mexicanos a aquello que consideramos valioso en nuestra cultura, que implica reconsiderar códigos de respeto profundo por lo propio, es decir nuestro patrimonio cultural (Carrillo et al, 2007).

Por ello es sumamente importante reforzar la identidad tanto de México como país, y en un entorno más específico, como región, estado, etc. Como respuesta ante esto el gobierno mexicano ha puesto en marcha distintos protocolos para respaldar la identidad del país, uno de ellos ha sido definir u otorgar denominación de origen a productos característicos de nuestro país.

A través del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), la Secretaría de Economía (SE) publicó en 2016 el libro *“Denominaciones de origen”*. La primera y más emblemática es el tequila en 1974, la más reciente fue otorgada al arroz del estado de Morelos en el 2012 (IMPI, 2012).

El sotol, Sereque o cuchara es una planta endémica de una vasta región localizada entre dos grandes sistemas montañosas de Norteamérica, las sierras madre Oriental y occidental, Gran parte del estado de Chihuahua se encuentra en dicha región, de carácter semidesértico y desértico. Antiguamente era utilizada como alimento, secando la parte turgente y moliéndola para producir harina con la cual se preparaba una especie de pan, es utilizado como forraje en tiempos de sequía en las aunque no se comercializa como tal, los granos son muy importantes para la alimentación humana como animal se puede utilizar como adornos de iglesias ya que es una fibra exótica y rústica muy resistente que

decora interiores y exteriores de casas (Reyes-Valdes, M. Humberto & Benavides-Mendoza, Adalberto & Ramírez, Homero & Villarreal-Quintanilla, J.A.. (2013).

La importancia de recursos no maderables como son los agaves arbustos rosetiformes como es el caso de *Dasylirion spp.*, radica en su potencial uso para la fabricación de bebidas alcohólicas destiladas como lo son tequila, mezcal, bacanora y sotol, gracias a sus altas concentraciones de azúcares fermentables en forma de fructanos e inulinas (Mancilla-Margalli, 2006). En éste caso los destilados más explorados y conocidos son el mezcal y tequila principalmente, en ambos casos se cuenta tanto con un perfil organoléptico como los grupos microbianos que mayoritariamente participan en su fermentación (Godínez, 2012), múltiples estudios revelan que la fermentación es llevada a cabo por un consorcio de levaduras, hongos y bacterias ácido lácticas, dentro del cual la levadura principal es *Saccharomyces cerevisiae* debido a su excelente capacidad de producción de etanol y a la tolerancia a alta concentraciones de mismo (Ribéreau-Gayon Pascal, Denis, Bernard, & Aline, 2006). Actualmente se conoce la participación de géneros de levaduras no *Saccharomyces* en el proceso e inicio, lo que influye en las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas (Bourgeois y Larpent, 1995).

3.1 Trabajos realizados en sotol

En Coahuila en el 2006 se realizó un trabajo en el cual se aislaron e identificaron tres cepas de levaduras, las cuales debido a su morfología y pruebas bioquímicas correspondían a los géneros, *Saccharomyces spp.*, *Hansenula spp.* y *Pichia spp.*, en este estudio no se realizaron secuenciaciones moleculares para confirmar el género y especie (Domínguez, 2006). En el año 2017 se identifican las comunidades microbianas presentes en mostos fermentados de sotol de la región de Potrero del Llano en el estado de Chihuahua, logrando identificar microorganismos de las familias *Nectriaceae*, *Bionectriaceae*, *Pichiaceae*, *Trichocomaceae*, y *Dipodasceceae*, y en cuanto a las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, los cuales fueron secuenciados molecularmente (Torres,

2017). A su vez se realizó un trabajo en el cual se estudió la relación levadura-bacteria (específicamente BAL), en el cual el objetivo fue elegir una combinación que permita una supervivencia en medio de fermentación con altas concentraciones de etanol y azúcares y que a su vez tenga producción de metabolitos secundarios de interés , el cual resultó que la relación entre *Kluyveromyces marxianus* y una cepa de *Leuconostoc spp.* tuvo un aumento en producción de etanol y compuestos volátiles (Guardado, F. R. T, 2017). La UNAM como parte de una colaboración con la Universidad Autónoma de Chihuahua en el 2018 realizó un estudio en el cual se identificaron las levaduras que participan en la fermentación natural para la producción de sotol , dicha investigación reporta que la fermentación se llevó a cabo en su mayoría por levaduras del género *Saccharomyces*. De los cuales las levaduras mayoritarias fueron *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces marxianus*, también con presencia de *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Rhodotorula*. sin embargo, no todas ellas participaron en la fermentación (Franco, 2018). En el aspecto de compuestos volátiles de interés en el sotol en el 2001 se realizó una comparación entre los volátiles contenidos en tequila, mezcal y sotol, encontrando que el sotol tiene mayor cantidad de volátiles (25) contra tequila y mezcal (15 y 18, respectivamente), además en dicho estudio mencionan al 3-hidroxi-2-butanona como un marcador único para el sotol (López Pérez & Guevara Yáñez, 2001), en el 2008 se realizó una caracterización de sotoles y tequilas por técnica de cromatografía de gases en donde los compuestos en dos diferentes marcas de sotol fueron : C2 butanol, propanol, isobutanol, C2 y C3 metil-butanol, acetato de etilo, alílico, C8C2, C1-hexanol, C5, C4 y benzaldehído,

Correspondientes al sotol Coyame blanco, y coyame reposado con un perfil ligeramente herbáceo, notas frutales a plátano, manzana, pera y presencia de mantequilla. En el sotol mesteño predominó el furfural, etilo laurato, ácido cáprico, ácido láurico, ácido isobutírico y bencílico, con aromas afrutados, florales y ligeramente ahumados (Lara et al., 2008) , en el 2016 se realizó un análisis comparativo de contenido de compuestos volátiles entre muestras de sotol artesanal de dos zonas de Chihuahua, Madera y Aldama, se encontraron en

promedio 39 compuestos volátiles en las muestras de Aldama con un mayor contenido de volátiles pungentes y agasolinados, mientras que las muestras de Madera tienen en promedio 30 compuestos volátiles, los cuales brindan un perfil más cítrico y afrutado (Contreras, 2016). Finalmente en el 2018 se realizó un estudio que involucra la cinética de formación de compuestos en fermentación natural, encontrando al etanol como metabolito primario, seguido del acetato de etilo y el ácido acético, los cuales provocan una disminución de etanol para formar dichos compuestos (Sáenz Fernández, 2018).

3.2 Bebidas alcohólicas destiladas de agave

México ha sido reconocido por su amplitud en cultura, paisajes, etnias, uno de los ámbitos más importantes son su gastronomía, y por supuesto sus bebidas alcohólicas, que llevan detrás leyendas milenarias y herencias patrimoniales, aunque esta categoría es muy amplia, mundialmente reconocidas son el tequila y el mezcal, sin embargo hay otras bebidas que con anterioridad han sido estigmatizadas debido a su dudosa procedencia o consideradas como un aguardiente de baja calidad, hoy en día gracias al trabajo arduo de familias que no dejan morir sus tradiciones, están ganando terreno frente a las bebidas anteriormente descritas, tal es el caso de la raicilla, bacanora, charanda y por supuesto el sotol. Todas estas bebidas llevan consigo generaciones de conocimiento y procedimientos artesanales que aportan un sentimiento de pertenecía y nostalgia, el cual se ve acentuado conforme la persona esta situada lejos del país, lo cual convierte éste vínculo en una importante cadena de suministro, que a su vez es parte de la difusión y promoción hacia el posicionamiento de otras bebidas mexicanas en el extranjero, sin olvidarnos de la situación interna, de la cual las actividades para darlos a conocer son mínimas. El perfil organoléptico de una bebida se define por una mezcla de compuestos volátiles, no volátiles así como las características del microorganismos que lo procesan, los compuestos aromáticos son detectados por los nervios olfatorios ubicados al final de la nariz, Los volátiles aromáticos livianos (de bajo peso molecular, polares y

compuestos hidrofílicos) son percibidos en un primer momento y, generalmente, tienen mayor impacto en la percepción humana (Ferrer Espinosa, 2016).

3.2.1 Tequila

Bebida obtenida al destilar las cabezas de agave *Tequilana weber* var. azul única subespecie permitida para su elaboración, endémica de la región de Tequila. Algunos volátiles que figuran son alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos, ésteres, compuestos azufrados y en menor concentración compuestos fenólicos, su perfil es descrito como notas caramelizadas, floral y frutal con diferentes intensidades y otros como pungentes, dulces y frescos (Acosta Navarrete et al,2007).

3.2.2 Bacanora

Bebida 100% de agave *Angustifolia haw* o agave *Pacifica trel*, actualmente conocido como agave *Vivípara L*, diferenciándose del tequila y mezcal por las características de la planta, condiciones climáticas imperantes en la región serrana de Sonora, fermentada por levaduras silvestres, es un licor claro y cristalino, (Gutiérrez-Coronado et al.,2007) Se describe como una bebida suave, con buen olor y sabor, altas notas afrutadas y ahumadas, en ocasiones con un tinte a cuero, no es demasiado fuerte y tiene cuerpo (Álvarez-Ainza et. al.,2015).

3.2.3 Mezcal

Obtenida de las cabezas cocidas de más de 50 especies del género Agave comúnmente llamado maguey, producido en aproximadamente 26 estados de México, el cual no tiene restricción de especie , siempre y cuando no se utilice una especie con denominación de origen para la producción de otro destilado, (Gómez Zamora et al.,2016). Es una bebida alcohólica obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas de agave. Los componentes mayoritarios son alcoholes saturados, acetato de etilo, 2- hidroxipropanoato de etilo y ácido acético. En menor

cantidad se encuentran otros tipos de alcoholes, aldehídos, cetonas, etil-ésteres de cadena larga, ácidos orgánicos, furanos, terpenos, entre otros.

Molina *et al.* (2007) describe que hay compuestos atípicos en los destilados tales como el ácido butanóico y el ácido 2- metil butanóico los cuales brindan aromas arranciados, grasa y sudor, según Guevara y colaboradores (2012) contiene cerca de 18 compuestos volátiles de los cuales , el componente principal son los esterres, sin embargo hay otros compuestos de importancia como son los alcoholes de cadena corta, cetonas , aldehídos, y determinan que el 5-metil-2-furancarboxialdehído es un compuesto único en el mezcal, el cual puede ser utilizado como compuesto de denominación de origen. El mezcal tiene un aroma dulce fuerte y afrutado, debido a sus altas concentraciones de dietil acetal, los frutales y a florados son causados por esterres alcoholes, mientras que los ácidos producen aromas a queso y rancio, los cuales son indeseables de percibir en una bebida alcohólica destilada, otros componentes minoritarios per no menos importantes son los furanos y terpenos los cuales provienen del procesamiento térmico del agave (Molina JA *et. al*, 2007).

3.3 *Dasyllirion* spp.

En 1985 se realiza un estudio filogenético a la planta de sotol, determinando finalmente que el género *Dasyllirion* pertenecen a la familia *noliniaceae*, se considera madura a partir de los seis años de edad, alcanzando un tamaño adulto entre 90 y 120 cm, se puede plantar durante todo el año, pero es de crecimiento lento a moderado, preferentemente debe existir un espacio de 150 cm entre cada planta, requerimientos de agua son pocos, sin embargo necesita altas cantidades de luz solar, flora a fines de primavera, principios de verano, con una flor blanquecina, está incluida en la categoría de cactus y suculenta, y en clasificación de arbusto y sub-arbusto(INIFAP, 2008). Según Benson y Darrow (1944), las principales características del sotol son las siguientes: los bordes de las hojas con espinas visibles; hojas lineales, largas, sobre el tallo principal; sépalos y pétalos

finos, blanquecinos; los estambres más largos que el perianto, de filamento delgado; frutos alargados, semilla encerrada en la parte central. Plantas caulescentes, tronco de 1-1.5 m de alto; hojas de 20 mm de ancho, ascendentes, de hasta 1 m de largo, ligeramente laciniadas, glaucas, ligeramente quillado rugosas, opacas, espinas generalmente separadas de 10 a 15 mm, de 2 a 5 mm de largo, amarillas, haciéndose rojas hacia arriba; inflorescencia de hasta 5 m de alto; fruto muy estrechamente elíptico, de 4-5 por 7-9 mm, el estilo apenas de la mitad de largo de la profunda muesca; semillas 2 por 3.5 mm.

Es un producto no maderable, que no susceptible para su aprovechamiento intensivo, cubierto de hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada, color verde, cuya parte aprovechable para la elaboración del licor, es la piña o cabeza;. Su apariencia puede ser la de palmeras altas, o de hierbas con grandes inflorescencias de sólidas y finas(Coello Coutiño, 2003). Tiene baja disponibilidad de algunos elementos como el N, P, Fe, Mn . En estos suelos pobres es especialmente importante la actividad microbiana para la vida de las plantas (Reyes Valdez et. al., 2013).

3.4 Proceso de producción

El proceso comienza con la selección de las piñas de *Dasyllirion spp.* las cuales idóneamente deben tener al menos 10 años de edad, y pesar al menos 30 Kg, se jiman y se parte en trozos grandes permaneciendo dos días en hornos de dos niveles, en el primer nivel se forma un cono con piedras y se colocan varias piñas las cuales se cubren con las mismas hojas de la planta y se rocía con agua, en el segundo nivel está la cámara de combustión , para hidrolizar los fructanos presentes en el tallo de la planta, los cuales adquieren un tono café al final del cocimiento, se calcula que tienen aproximadamente 24 °Brix. Se forma un montículo el cual es humedecido y se deja reposar entre 2 o 3 días, proceso llamado “Majado”, aquí la temperatura interna es de alrededor de 25°C, cuando la temperatura decae el proceso ha terminado, también en esta etapa se prepara la materia prima, previo a llevarlas a tanques de fermentación líquida, ya que el

majado es una especie de fermentación sólida que ayuda a propagar células de fermentación (de la Garza, 2000). Los trozos de piña se pasan a una pila de fermentación al nivel del piso y al aire libre ,se agrega agua en una proporción 1:2 (P/v) , formando el mosto de la fermentación alcohólica la cual se desarrolla a una temperatura cercana a los 25 °C con un pH inicial de 4.5 y en la fermentación disminuye hasta 4 al tercer día, la concentración inicial de azúcares solubles es de los 8 a 12 °Brix., la fermentación dura entre 3 y 4 días. Al finalizar la fermentación, se pasa el mosto con todo el resto de las piñas al destilador para lograr la concentración de alcohol .El primer litro de la destilación se separa y esto es conocido como las “cabezas”, el resto del destilado es conocido como “agua vino” y tiene inicialmente una concentración de alcohol de 35 °GL, que van disminuyendo durante la destilación hasta llegar a 14 °GL. El producto de la primera destilación se pasa a una segunda destilación para obtener un producto incoloro con un contenido de alcohol entre 48 y 50% eliminando el residuo con menor contenido alcohólico conocido como “colas” (De la Garza, 2000).

El sotol puede describirse como una bebida destilada obtenida a partir de fermentación y destilación de cabezas de *Dasyilirion spp.* producida en las regiones de Durango, Coahuila y Chihuahua, delimitado por su denominación de origen. La presencia de C2 butanol, propanol, isobutanol, C2 y C3 metil-butanol, acetato de etilo, alílico, C8C2, C1-hexanol, C5, C4 y benzaldehído brindan un olor ligeramente herbáceo, con toques a frutas como el plátano, manzana, pera y presencia de mantequilla., mientras que la presencia de furfural, etil laurato, ácido cáprico, ácido laúrico, ácido isobutirico y bencílico aportan otros aromas afrutados, florales y ligeramente ahumado. Actualmente el proceso de producción de sotol se realiza en su mayoría de forma artesanal, en su producción hay un proceso de fermentación, se sabe que esta mediada por acción metabólica y enzimática de microorganismos (Lara et al., 2008).

3.5 Fermentación

Se define bioquímicamente como el proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores como aceptores terminales de electrones. Tomando el concepto de Microbiología Industrial, es cualquier proceso utilizado para la generación o conversión de productos mediante cultivo de microorganismos (Shirai Matsumoto, 2013).

3.5.1 Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es uno de los procesos más importantes para la síntesis de los compuestos de aroma. Bioquímicamente es compleja para convertir azúcares fermentables en energía, en etanol y CO_2 (ecuación 1) por la vía metabólica conocida como Embden-Meyerhof, es la base de la vinificación, en la que no sólo la producción de etanol es importante, sino otros metabolitos secundarios que brindan calidad e identidad a una bebida alcohólica(Shirai Matsumoto,2013).



Ecuación 1

Para este proceso el microorganismo más utilizado a escala industrial es *Saccharomyces cerevisiae*, por lo cual también es la levadura más estudiada, sin embargo existen otras levaduras, bacterias y hongos que realizan fermentación alcohólica (Vázquez, H.J, & Dacosta, O. (2007). Subsecuente del transporte de los monosacáridos fermentables, sucede la glucólisis, que es catalizada por la acción de cerca de 10 enzimas que permiten obtención de piruvato a partir de glucosa o fructosa, luego el piruvato se convierte a etanol a través de la fermentación alcohólica, una reacción con acetaldehído como intermediario, y finalmente es convertido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Álvarez-Ainza,et al., 2015). Junto con el glicerol, contribuye a la viscosidad proporcionando cuerpo a la bebida, además de otros metabolitos como son los esteres, aldehídos, cetonas, alcoholes superiores, que proporcionan un perfil

aromático característico dependiente de la materia prima y el microorganismo utilizado para el proceso.

Los alcoholes superiores que se generan en mayor concentración durante la fermentación son alcohol isoamílico, isobutanol, alcohol amílico activo, 1-propanol, alcohol fenetílico y 1- butanol (Téllez-Mora y Cedeño-Cruz, 1997).

3.6 Levaduras involucradas en procesos de fermentación de mostos

Variedad de autores reportan que en la producción de vinos, los géneros mayoritarios en la fermentación son *Hanseniaspora*/ *Kloeckera*, *Cándida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*). Posteriormente estos géneros reducen su número, dando paso al crecimiento de otras especies más tolerantes al etanol como *Saccharomyces spp.* (Ribereau, 1985), por otro lado subsisten las no *Saccharomyces* , las cuales son particularmente importantes, ya que sintetizan compuestos volátiles que contribuyen al bouquet de la bebida (Díaz y col., 2008).

3.6.1 *Pichia spp.*

Sus células son ovaladas alargadas, en cadenas alargadas y a veces ramificadas, con unas dimensiones de 2 a 17 μm . En medio líquido se desarrolla rápidamente un velo, desprendiendo un característico olor a acetato de amilo, de carácter oxidativo y con formación de acidez volátil, siendo considerada como una levadura indeseable (Ribéreau-Gayon et. al.,2006).

3.6.2 *Kluveromyces spp*

Se diferencian de las del género *Saccharomyces*, por la forma de sus esporas y tendencia de aglutinación cuando se rompe el asca, así como factores de

crecimiento. Una de las especies más conocidas es *Kluyveromyces thermotolerans*, microscópicamente son células redondeadas cuando son jóvenes, aisladas o agrupadas por pares, y con unas dimensiones de 3 a 6) x (4 a 8) μm . En un medio de cultivo se observa un característico halo o anillo circular.

Forma grandes cantidades de ácido láctico, del orden de 1,5 a 1,8 gramos/litro frente a 0,2 gramos/litro en las *Saccharomyces*, y pequeñas de ácido acético; se consideran como "acidificantes" (Ribéreau-Gayon et. al.,2006).

3.6.3 *Saccharomyces spp.*

La especie más representativa es *S.cerevisiae* es la especie de levaduras que desarrolla la mayor parte de la fermentación alcohólica, dominando rápidamente el medio fermentativo y dejando al resto de las levaduras como meras colaboradoras en proceso de elaboración de los vinos. Una vez terminada la fermentación, también desaparece con rapidez, siendo otras especies más resistentes al alcohol y al anhídrido sulfuroso, las responsables de posibles refermentaciones de los azúcares residuales (Ribéreau-Gayon et. al.,2006).

3.6.4 *Torulaspora spp*

Ha sido una de las levaduras no convencionales más estudiadas en los últimos años debido su potencial de producción de compuestos interesantes que enrobustecen el flavor de bebidas (Puertas B. et al.,2018). *Torulaspora delbruecki* es la representante con aplicaciones en producción de aceites, queso, y café , y presenta una enzima de suma importancia en la industria del mezcal la cual muestra actividad máxima pH entre 4.5 5.5 y a una temperatura de 45 °C para inulina ,(Trujillo García, 2015). Presenta interesantes propiedades biotecnológicas), entre las cuales esta su tolerancia de congelación (Hernandez-Lopez, 2003) y una alta osmotolerancia (Tofalo et al., 2009), utilizada para la fermentación de masa , se ha aislado de mostos de mezcal y se tiene registro de

su capacidad de producción de fructosiltransferas, (Arrizon et. Al, 2012). Se caracteriza por una baja producción de acetaldehído, ácido acético, sulfuro de hidrógeno y fenoles volátiles, Se ha demostrado una interacción sinérgica positiva para las especies de *T. delbrueckii* / *S.cerevisiae* en fermentaciones secuenciales utilizando ciertas variedades como Sauvignon Blanc (Renault, Coulon, Moine, Thibon, y Bely, 2016).

3.6.5 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son bacterias ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, no solamente por su gran capacidad de acidificar y producir altas concentraciones de ácido láctico, sino por otras características como agentes fermentadores y conservadores (Axelsson I., 1993). El ácido láctico se produce a través de la fermentación de la lactosa, de sabor ácido fresco en leches fermentadas, mejora cuerpo y textura en los quesos y evita el desarrollo de microbiota contaminante y patógena (Salminen, S., Von Wright, A. (1993). En la fabricación de vino aparecen principalmente 4 géneros de bacterias ácido lácticas "BAL" (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*), ya que son tolerantes a la acidez y al etanol, lo que les permite desarrollarse en condiciones desfavorables para otros microorganismos (Guardado, f. r. t. I, 2017). Son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm , son anaerobias facultativas y catalasa negativa. Se pueden dividir en heterofermentativas las cuales producen solamente 50% de ácido láctico, fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO_2 , 1 mol de ATP es generado por mol de glucosa y las homofermentativas que utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa (Salminen, S., Von Wright, A. 1993).

3.7 Compuestos volátiles presentes en un destilado

Hay una clasificación de niveles aromáticos los cuales constituyen el “bouquet” de la bebida, algunos autores refieren tres y algunos otros cuatro, si tomamos en cuenta cuatro niveles e, primer nivel correspondería al suelo en el cual se encuentra la materia prima, el segundo nivel a la propia materia a procesar, el tercer nivel corresponde a los microorganismos involucrados, tiempo y forma de procesamiento, y el cuarto nivel correspondería al almacenamiento dado, el tipo de barrica, el material, la humedad del almacén, etc.

3.7.1 Alcoholes

El más importante de este grupo es el etanol, a pesar de su carácter de bebida alcohólica, también cumple función de fijar aromas, y es el mayoritario en bebidas destiladas, también se encuentra el metanol, y algunos otros alcoholes superiores, en esta misma categoría se encuentra el fusel, que son de alto peso molecular y le confiere a la bebida un sabor picante, éstos son menos volátiles que el etanol, se producen por el consumo de carbohidratos así como de los aminoácidos por el mecanismo de Erlich por descarboxilación y desaminación, es importante la detección de 2-butanol, ya que se ha relacionado con defectos generados por bacterias y hongos en vinos, la cantidad de alcoholes aumenta en relación con la concentración de fuentes de nitrógeno en el medio, cuando la concentración de esteres y ácidos aumenta, el fusel disminuye (Queris, 2007).

3.7.2 Ésteres

Es el grupo más interesante y robusto de los volátiles en bebidas destiladas, uno de sus más abundantes representantes es el acetato de etilo, el cual se encuentra tanto en el interior de la levadura como disuelto en el medio de fermentación, la proporción de esteres etílicos y ácidos grasos transferidos al medio disminuyen

con el aumento de la cadena carbonada, brindan los aromas afrutados (Queris ,2007).

3.7.3 Compuestos carbonílicos

El acetaldehído es el compuesto mayoritario de esta familia, tiene un importante papel en la sensación de picor, por otro lado el diacetilo es el portador del aroma a mantequilla, se forman en el exterior de la célula por la descomposición del α -cetolactato (Queris ,2007).

3.7.4 Ácidos grasos

Son moléculas de alto peso molecular, y no siempre aportan aromas agradables, en una fermentación aerobia llega a estar presente en un 75% el ácido acético, la membrana plasmática de la levadura regula el movimiento dentro y fuera de ella, las concentraciones circundantes están ligadas a las capacidades lipolíticas, el tamaño de la molécula y las ramificaciones (Queris ,2007).

3.7.5 Compuestos fenólicos

Estos compuestos surgen por procesos de descarboxilación, los polifenoles provenientes de la madera del barril son por procesos de hidrólisis:alcoholisis:oxidación, que dan un carácter añejado (Queris ,2007).

3.7.6 Compuestos azufrados

Algunos ejemplos son los dimetil sulfuro, metil etil sulfuro entre otros, se forman por autólisis de los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína, dan olores indeseables, sin embargo al entrar en contacto con el cobre de los condensadores, son fácilmente eliminados (Queris ,2007).

4 Justificación

Este trabajo tiene como objetivo la exploración del uso alternativo de cepas de levaduras no *Saccharomyces* aisladas a diferentes tiempos de mosto fermentado como levadura fermentadora principal que permita una homogeneidad en la producción de sotol.

5 Hipótesis

Existe al menos una levadura aislada del mosto fermentado de sotol (*Dasytirion spp.*) cuya capacidad de producción de etanol tiene potencial para ser aplicada en bioprocesos fermentativos.

6 Objetivos

6.1 General

Evaluar la capacidad de producción de etanol de levaduras nativas de mosto de sotol así como identificar el efecto de adición bacterias ácido lácticas en la producción de compuestos volátiles

6.2 Específicos

- Determinar las característica físico-químicas de la planta.
- Evaluar la fermentación de 6 cepas de levaduras de distintos géneros en un medio sintético para seleccionar las dos cepas con mejor capacidad de producción de etanol.

- Estimar el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas en la producción de compuestos volátiles y etanol durante la fermentación de mosto de *Dasyliirion spp.*

7 Materiales y métodos

7.1 Materiales y equipo utilizados:

- Secador industrial de flujo laminar
- Incubadora con agitación marca Labnet international modelo 211 DS
- Autoclave yamato modelo SQ500C
- Licuadora industrial marca Whirlpool
- Agar PYD marca Difco (Beckton Dickinson , E.U.A)
- Fructosa anhidra RA marca CTR scientific (Monterrey ,NL)
- Acido dinitrosalicílico (Sigma Aldrich,)
- Campana de flujo laminar Labconco A2
- Matraces Erlen Meyer de 500 y 250 MI
- Peptona marca Difco
- Sulfato de amonio (J.T Baker)
- Sulfato de magnesio (J.T Baker)
- Extracto de levadura (J.T Baker)
- Microtubos de 1.5 mL
- Glicerol (J.T Baker)
- Ácido sulfúrico (J.T Baker)
- Mezcla reactiva de selenio (J.T Baker)
- Indicador mixto
- Octanol (J.T Baker)
- Microkhejda
- Asa de nicromio
- Cajas Petri

- Micropipeta de 1 ml
- N-butanol (J.T Baker)
- Alcohol etílico absoluto (J.T Baker)
- Mosca magnética
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Jeringa de Head Space de 2.5 ml
- Fibra para SPME de polimetilsiloxane/divinilbenzeno
- Tapones de algodón
- Agar MRS (Sigma Aldrich)
- Buffer de fosfatos pH 7 (Sigma Aldrich)
- Viales de tapa magnética de rosca de 20 mL (Agilen Technologies).
- Termómetro 0-60 °C.
- Matraces Erlen Meyer 500 y 250 mL

7.2 Procesamiento de la materia prima

Al recibir la piñas se determinó su humedad inicial, diámetro, y peso, el 50% del peso total fue secado en un secador del taller de alimentos, con rampa de temperatura de 50°C 2h, 55°C 2h, 60°C dos horas y 65°C 2 horas, con éste procedimiento se logró disminuir de 75% a un 50% de humedad, por lo cual para conservarlo en condiciones óptimas hasta su uso y evitar ataques fúngicos, se cortó en trozos pequeños y se secó en el horno a 70 °C hasta reducir humedad de aproximadamente 20%.

Para conocer la proporción adecuada para el cocimiento de la piña, se hicieron pruebas en matraz con proporciones de agua (V/p) 2:1, 3:1 y 4:1, se determina que la proporción 2:1 permite una buena manipulación de materia prima, se determina también el tiempo de cocción en autoclave a 121°C y 15 libras de presión , variando el tiempo de 30 min a una hora (De La Garza-Toledo, 2008). Se determina que el tiempo de cocimiento óptimo es a los 30 minutos ya que a la hora los °Brix del mosto se ven disminuidos, de 15 a cerca del 9, por lo

cual la proporción final de agua es de dos volúmenes por cada volumen de piña y el °Brix del mosto es de 15.5, el cual será ajustado a °Brix 8 con agua al momento de realizar las fermentaciones.

Para determinar la composición fisicoquímica de *Dasyllirion spp.* se utilizaron las técnicas descritas por la AOAC (1998). las cuales determinan humedad, grasas, carbohidratos, fibra cruda, proteína, y cenizas.

7.3 Evaluación de producción de etanol de levaduras

Las cepas utilizadas en el presente trabajo son seis las cuales son pertenecientes dos al género *Pichia*, dos al género *Kluveromyces* , una *Torulaspora* y una *Naganishia*.

7.4 Preparación de material y cepas a utilizar

Se utilizaron matraces Erlen Meyer de 500 mL , los cuales para asegurarse de que no contengan sustancias ajenas al experimento, fueron lavados y llenados con agua desmineralizada, se llevaron a autoclave a esterilización, éste proceso se realizó tres ocasiones para eliminar remanentes, finalmente se esterilizaron vacíos y se enfriaron en campana de flujo laminar . Las cepas se sembraron en agar YPD del cual se prepararon 100 mL , por lo cual el agar se preparó con 4g de dextrosa, 4g de peptona, 4g de agar bacteriológico, y 2g de extracto de levadura, se clarifica al calor del mechero y se esteriliza por 15 min a 121°C a 15 lb de presión, al llegar a temperatura de aproximadamente 40 °C se vació el agar en las cajas petri, una vez solidificadas se sellaron con parafilm y se metieron a incubara 37°C por 24h para descartar contaminación. Con ayuda de una micropipeta con puntas previamente esterilizadas, se toma una pequeña cantidad del crio vial el cual esta a -80°C con glicerol, y se estrió en la caja petri, las cajas inoculadas se incubaron a 25°C por 24 h.

7.4.1 Preparación del medio sintético

Para la etapa de screening de las seis cepas a evaluar se preparó un caldo experimental el cual será el mismo para realizar el precultivo el cual se preparó con 1g/L de Hidróxido de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.5g/L de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1g/L de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), y 2.5 g/L de extracto de levadura, como fuente de carbono se adicionan 50g/L de D-fructosa, sin embargo para evitar reacción de Maillard se esterilizaron por separado, y una vez fríos, se mezclaron en frascos Durán de 1L en la campana de flujo laminar.

7.4.2 Preparación del preinóculo y fermentación de medio sintético

Se prepararon tubos con rosca a los cuales se les adicionaron 15 mL de caldo experimental a cada tubo, se tomó una colonia de la caja Petri anteriormente incubada y se inoculó el caldo, de esa muestra se realizaron tres diluciones subsecuentes de 1:10, 10:100 y 10:1000 respectivamente, agitando por medio de vórtex y esperando un total de 10 seg de asentamiento entre cada dilución, las pipetas utilizadas así como los tubos se esterilizaron previamente mediante autoclave a las condiciones antes descritas, y las zonas de inoculación, en el caso de la mesa de trabajo, se higienizó con benzal y se mantuvo la zona estéril con ayuda de dos mecheros bunsen, en el caso de la campana de flujo laminar, se higienizó con benzal y posteriormente se aplicó luz UV por un periodo de 15 min, los tubos con el preinóculo se incubaron por 24 h a 30°C y 150 rpm, se tomó como punto óptimo de inoculación la muestra que tuviera una absorbancia cercana al 1.6, por lo cual se midió la densidad óptica de las muestras a 660 nm en un espectrofotómetro modelo lambda 25 de Perkin Elmer, para lo cual se utilizó como blanco una muestra de caldo experimental

sin inocular, se leyó el blanco para ajustar la absorbancia acero, y se leyeron las muestras. De la muestra seleccionada como óptima se tomaron 5 mL y se inocularon en 250 mL de caldo experimental es decir, se inoculó al 2%v/v, por duplicado, ya que se varió la condición de agitación que corresponde a 0 y 150 rpm y se mantuvieron ambos experimentos 30°C a lo largo de la fermentación. Las fermentaciones se realizaron a 30°C, a dos diferentes agitaciones (0 y 150 rpm), sin control en pH por un periodo de 6 d.

7.4.3 Fermentación de mosto de *Dasyllirion spp.*

Para esta etapa de fermentación se utilizó el jugo obtenido de la hidrólisis de la piña de *Dasyllirion spp.* obtenido en la etapa inicial experimental de éste proyecto, el cual se obtuvo mediante tratamiento térmico en autoclave a 121°C por 15 min y posteriormente el jugo fue obtenido por medio de proceso de molienda y prensado, se obtuvieron aproximadamente 8 litros de jugo con un °Brix de 15.

Se preparó un preinóculo con las cepas *Kluveromyces spp.* (a) y (b) el cual consistió en la formulación de un caldo con peptona, fructosa y extracto de levadura (PFY), se tomó una colonia de un agar con una antigüedad de 24 h y se inoculó el caldo, el cual se incubó a 30°C durante 48 h a 150 rpm para permitir la multiplicación de las levaduras y obtener una cantidad suficiente de biomasa, posteriormente el medio se centrifugó a 3500 rpm y se decantó para obtener solamente la biomasa, se realizaron tres lavados con buffer de fosfatos pH 7 para eliminar remanentes del caldo de cultivo y evitar interferencias de éstos componentes, se concentra finalmente la biomasa en un tubo cónico estéril de 15 mL. A partir de la biomasa concentrada en el tubo cónico se tomaron 3 mL de biomasa y se añadieron a 100 mL de mosto (ajustado a 8°Brix rpm por 24 h. Terminada la incubación se inició inmediatamente con el proceso de inoculación para la fermentación. Las muestras a fermentar se inoculan al 2% v/v en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 150 ml de mosto y se adicionaron 3 ml de preinóculo, se incubaron a 30°C sin agitación y la

fermentación se detuvo al sexto día. Para la selección de la cepa se tomó como principal variable de *respuesta* la producción de etanol al final de la fermentación.

7.4.4 Fermentación *Kluyveromyces spp.* y bacterias ácido lácticas

Se tomaron cuatro cepas de bacterias ácido lácticas al azar, de las cuales tres fueron G+ y una G-, las cepas se estiraron a partir de crio viales y fueron incubadas a 37 °C 24h, se tomó una colonia de cada cepa y se inoculó en caldo MRS la incubación para la multiplicación de la biomasa duro 72 horas, la biomasa se colecto por medio de centrifugación a 3500 rpm por 6 minutos y se realizaron tres lavados con buffer de fosfatos, se inoculó 1 ml en 50 ml de mosto y se incubó por 24h. En el caso de *Kluyveromyces spp.* se realizó el preinóculo como se menciona en la sección 5.3.4., así como el proceso de fermentación.

7.5 Análisis de datos

El procesamiento y evaluación estadística de datos se llevó a cabo mediante dos programas estadísticos, SPSS y Minitab , por medio de un ANOVA one way con nivel de confianza del 95% .

7.6 Técnicas aplicadas

7.6.1 Densidad óptica

Se utilizó una densidad óptica de 600 nm, y una absorbancia de 1.6 como parámetro de referencia para realizar el inóculo.

7.6.2 Evolución de pH

Se utilizó un potenciómetro marca Orión , para el cual se calibró previo a su medición seleccionando la opción calibrar (F2), aceptar (3), canal 2, aceptar, e introducir el electrodo en la solución buffer pH 4, comenzar (F3), esperar estabilización de lectura, aceptar (F2), guardando la lectura, se repitió el proceso para los pH de 7 y 10, limpiando con agua desmineralizada entre cada lectura, se presiona el botón de calibración lista (F3) y almacenar calibración (F2), se corrobora la calibración leyendo uno de los buffers calibrados , y se toma el pH cada 24 h desde el día 0-6 de fermentación, para realizar una cinética de evolución de pH a través del tiempo.

7.6.3 Viabilidad celular

Se realizó conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) mediante la técnica de Miles&Misra (1983), para lo cual se realizaron diluciones de 100µL de muestra en 900 µL de solución fisiológica al 0.80% desde el control hasta una dilución 1:1000 en microtubos de 1.5 mL previamente esterilizados, los cuales fueron sometidos a vórtex antes de realizar la dilución , se tomaron 100 µL y se inocularon a una distancia aproximada de 2.5 cm, esperando a que seque en la campana del flujo laminar, se incubaron durante 24 h a 30°C , y se realizó el conteo, se tomó en cuenta la dilución que contuvo entre 3 y 30 colonias , y para el cálculo final se realiza la siguiente operación:

$$UFC = \frac{UFC \text{ contadas}}{alicuota \text{ inoculada}} * 1000$$

Ecuación 2

7.6.4 Determinación de consumo de azúcares reductores

Se realizó con la técnica del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS, Miller 1959), con la modificación de escala, de manera que se utilizó menor cantidad de reactivo, el cual se prepararon 100 mL, con lo cual se tomaron 1g de DNS y 30 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle) a 80 mL de NaOH 0,5 N , se calentó suavemente para disolver los reactivos. El volumen se completó hasta 100 mL con agua destilada, se filtró para evitar precipitaciones, se colocó en un frasco ámbar y se refrigeró hasta su uso, para la determinación de azúcares reductores se realiza una curva de calibración con fructosa de 2, 5, 10, 15, y 20 g/L , al igual que un blanco , para lo cual se utilizan tubos de ensaye a los cuales se les adicionó 50µL de muestra, 50 µL de DNS, se pusieron a reaccionar a baño María en agua en ebullición por cinco min, y posteriormente se enfrían en agua con hielo por 15 minutos, se añaden 500 µL de agua destilada y se colocan en micro placa, posteriormente se realiza la lectura en el microlector de placa a 595 nm, por medio de la ecuación de la recta de la curva de calibración se calcula la cantidad de la fructosa consumida a lo largo de la fermentación.

7.6.5 Determinación de producción de etanol por Head Space

La preparación de las muestras se realizó a una dilución 1:50 que corresponde a 200 µL en un aforo final de 10 mL, se adiciona un estándar interno de 50 ppm de n-butanol el cual es adicionado a partir de un estándar de 1000 ppm, es decir se adicionaron 10 µL de n-butanol y se aforó hasta 10 mL, por lo cual se adicionaron 500 µL de ésta solución a la muestra, se preparó una curva de calibración de etanol con concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 750 ppm adicionadas con estándar interno de n-butanol. 10 mL de cada muestra se coloca en viales de 20 mL de tapa de rosca y se identificaron, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent technologies con detector de masa modelo 7890B. Mediante la técnica de Head Space la cual consiste en calentar la muestra a 70°C con agitación constante a 500 rpm por un periodo de 30 segundos para generar equilibrio en el espacio de cabeza y la

volatilización de los compuestos contenidos en la muestra, en la primera etapa fue solamente etanol, se inyectó 1mL de vapor en el cromatógrafo el cual estaba en las siguientes condiciones de operación: columna HP Innowax con Helio como gas acarreador, con una temperatura de inyección de 220°C, flujo 1ml/min, un Split de 5:1 y una rampa de temperatura como muestra la tabla 1, tiempo de análisis de 10.875 min en total, tiene un tiempo de retención entre 3 y 4 min, con una aproximación de 3.45 min, cuantificando los iones 31, 45, 29, 27, mientras que el butanol aparece entre el min 6 y 7 con una aproximación al 6.7 min cuantificando los iones 56, 31, 41, y 43. Para el cálculo de concentración de etanol se tomó en cuenta la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración, la relación área del etanol/área de butanol se multiplica por el valor de la pendiente, y se le suma el valor del intercepto, este resultado se multiplica por la concentración se adicionada de estándar interno y por el factor de dilución utilizado. Se grafican las concentraciones para evaluar la cinética de producción de los últimos tres días de fermentación y tomar la decisión del tiempo que durará dicho proceso.

Tabla 1. Rampa de temperatura para determinación de etanol.

	°C/ MIN	TEMPERATURA (°C)	MANTENIMIENTO (MIN)	TIEMPO DE ANÁLISIS
INICIO		40	2	5
RAMPA 1	10	60	5	5
RAMPA 2	8	85	0	0
RAMPA 3	-	120	0	0
TIEMPO				10.875

$$\text{concentración de etanol} = \left[\frac{\text{área etanol}}{\text{área butanol}} \right] (\text{valor de m}) + \text{valor de b} \Big] * \text{ppm butanol} * \text{dilución de la muestra}$$

7.6.6 *Análisis de mostos mediante técnica Head Space-SPME*

Para esta prueba se utilizaron viales de 10 mL con 3 ml de muestra sin dilución , El análisis por SPME una variante al método Head Space el cual consiste en exponer una fibra de polimetilsiloxane/divinilbenzeno durante 30 min a una muestra en agitación y calentamiento constante (65 °C) por 30 min, hasta que se alcance un equilibrio en el espacio de cabeza, lo cual provoca que los compuestos de la muestra se volatilicen por puntos de ebullición, los cuales por fenómenos de adsorción se adhieren a la fibra expuesta, la cual es insertada y expuesta directamente en la septa del cromatógrafo que está a una temperatura de 225°C, por fenómenos de desorción los compuestos son separados de la fibra y acarreados por el Helio y detectados por el detector de masas, realizando un barrido en forma “Scan” para visualizar los componentes de las muestras, el tiempo de análisis es de 55 min . la tabla muestra la rampa de temperatura para la técnica. La tabla 2 muestra las condiciones bajo las que se realiza la lectura de la muestra.

Tabla 2. Condiciones para análisis de mosto por SPME

	°C/ MIN	TEMPERATURA (°C)	MANTENIMIENTO (MIN)	TIEMPO DE ANÁLISIS
INICIO		40	5	5
RAMPA 1	5	200	14	55

8 Resultados y discusión

8.1 Caracterización de *Dasyilirion* spp.

La tabla 2 muestra los parámetros iniciales de las piñas, la edad recomendada para utilizar una piña, al igual que en los casos tequila, mezcal y bacanora es mínimo de 10 años, y por lo menos 30 kg de peso, el INIFAP estatal cuenta con tabulaciones para calcular la edad de las piñas en base a su diámetro y peso, en este caso tanto el diámetro como el peso no están en la tabulación, por lo que se desconoce la edad real de la piña, sin embargo el productor calcula una edad de entre 4 y 5 años.

Tabla 3. Características iniciales de las piñas de *Dasyilirion* spp.

Parámetro	1	2
Peso (kg)	7.440	10.840
Diámetro (cm)	82.7	90.9
^o Brix	15 ± 0.28	15 ± 0.28
AT	160.19 ± 0.802 g/L	160.19 ± 0.802 g/L
AR	57.12 ± 0.607 g/L	57.12 ± 0.607 g/L
Edad de la piña	ND	ND
Humedad	75.3%	75.44%

8.1.1 Composición fisicoquímica de *Dasyilirion* spp.

Jiménez Muñoz et al., (2016) reportan una humedad en agaves cercano al 70%, la humedad inicial de operación correspondiente a 34.45% (tabla 3) se debe a que la materia prima fue sometida a un proceso de deshidratación previo al cocimiento lo cual afecta en la humedad calculada al realizar el análisis proximal, el valor de humedad inicial fue de 75%, lo cual corresponde con el autor antes mencionado, los valores obtenidos de proteínas y cenizas son cercanos a los reportados en éste mismo trabajo, a pesar de no ser un agave los cuales tienen valores de entre 2.5 y 2 respectivamente. Se observa que hay un alto contenido de fibra cruda, lo que sugiere que una cantidad considerable de carbohidratos está contenida en forma de inulinas (Chávez Parga et al., 2016) las cuales son rotas por medio de hidrólisis calorífica a monosacáridos, siendo en su mayoría Fructosa.

Tabla 4 Composición fisicoquímica de *Dasyilirion* spp. previo cocción

% (P/p)	Promedio
Grasa	1.93 $\pm$ 1.71
Humedad	34.45 $\pm$ 0.72
Cenizas	1.57 $\pm$ 0.59
Proteínas	2.47 $\pm$ 0.58
Fibra Cruda	44.75 $\pm$ 2.21
Carbohidratos	15.22 $\pm$ 2.64

8.2 Fermentación fase de screening

8.2.1 Evolución de pH.

Las cepas con agitación (a) muestran un comportamiento más homogéneo en el descenso del pH a través de la fermentación con tendencia asintótica a partir del día 2, en ambas condiciones se observa la disminución rápida, *Naganishia* spp, y *Kluveromyces* spp “b” aparentemente se comportan con baja afinidad por la fructosa. Se ha reportado que el valor óptimo de pH en fermentación es en un rango de 4.5-5.5, que es el rango en el que se desarrolla *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo hay otras especies cuyas tolerancia al pH son cercanas al 3, y que generalmente son especies no *Saccharomyces* (Hernández Padilla et al., 2006). Se tiene la teoría que el descenso del pH también está relacionada con la producción de ácidos orgánicos así como de ácido acético, el cual es producido a partir de etanol (C.Genòmica, 2010).

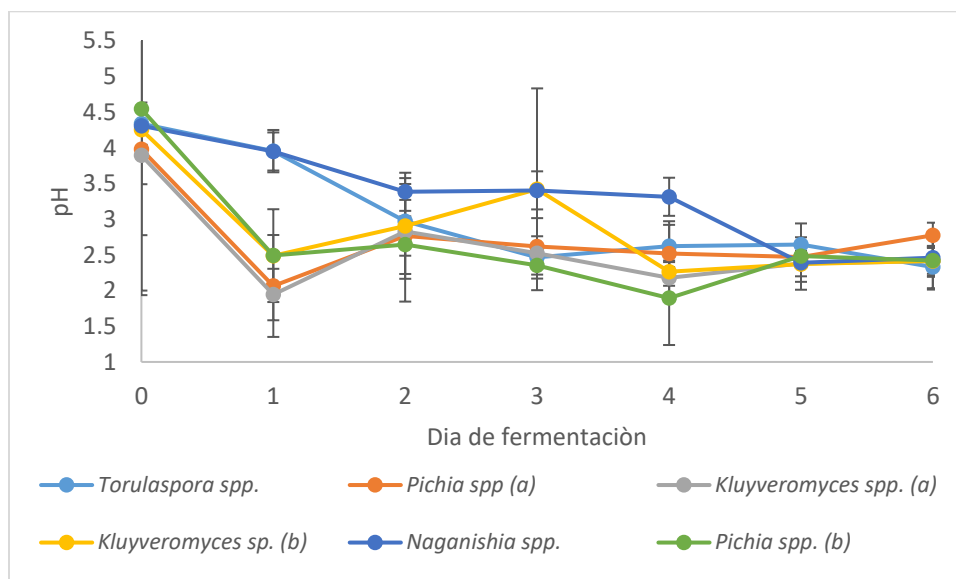


Figura 1. Evolución de pH a 150 rpm

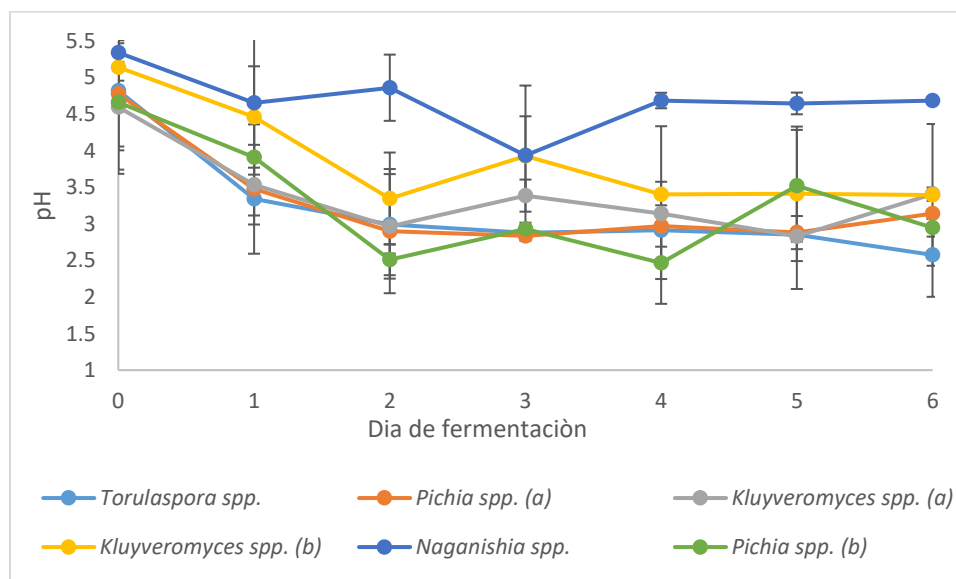


Figura 2. Evolución de pH sin agitación

8.2.2 Densidad óptica

Se puede observar que *Naganishia* spp. tiene un desarrollo celular menor a las demás cepas de levaduras, según un estudio en donde se encontró su existencia en queso azul, se le considera como una levadura no fermentadora. Según las cinéticas mostradas se supone que las levaduras han llegado a su fase

estacionaria y entran a fase estacionaria el día 2, y hacia el día 4 empieza a disminuir la población celular.

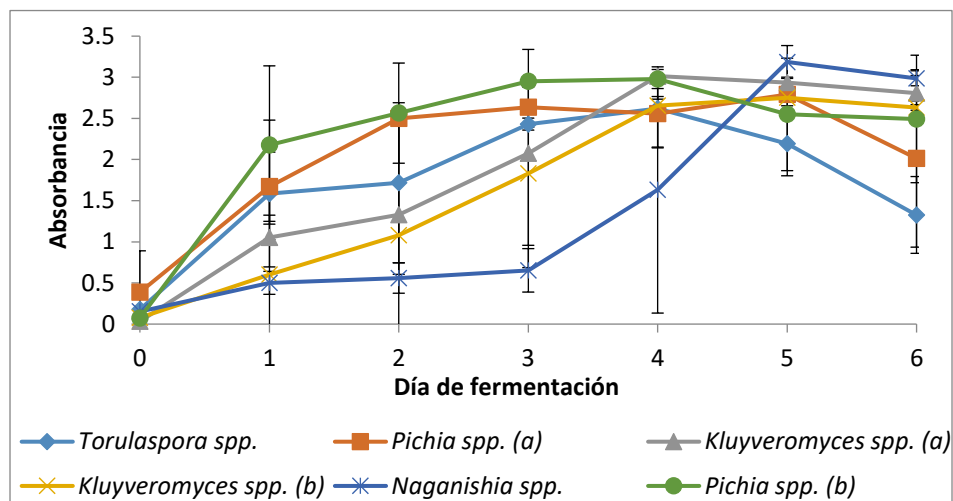


Figura 3. Evolución de densidad óptica a 150 rpm.

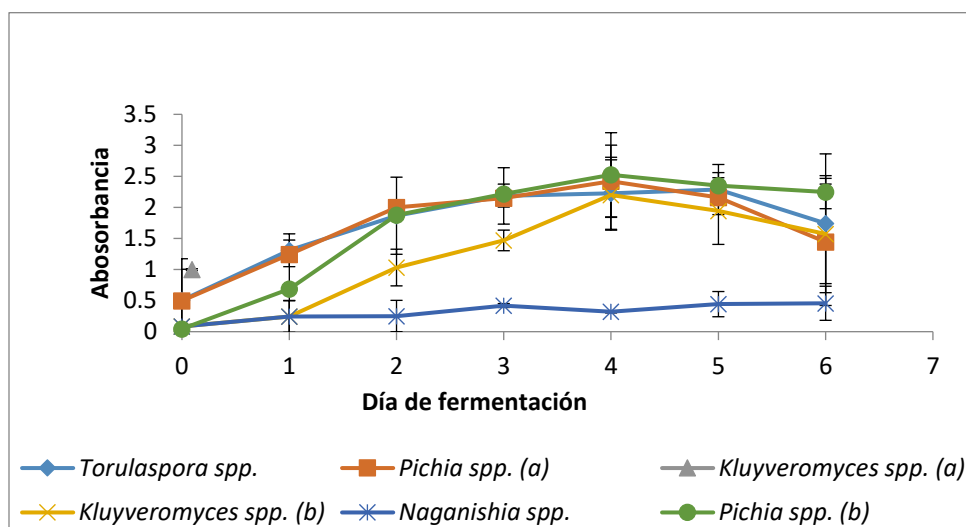


Figura 4. Evolución de densidad óptica sin agitación.

8.2.3 Unidades formadoras de colonia (UFC)

Se observa que en ambas condiciones el día dos las cepas alcanzan su fase estacionaria, permaneciendo cerca de las 10,000 células por mililitro hasta el día

cinco, a partir del cual comienza a disminuir la población de células viables en el día cinco de fermentación. La permanencia de las cepas es mayor a lo reportado en el caso de bacanora, en donde se menciona que las levaduras no *Saccharomyces* desaparecen alrededor del tiempo 3 de fermentación si la duración de la fermentación es de 5d (Álvarez-ainza, Zamora-quiñonez, & Acedo-félix, 2010).

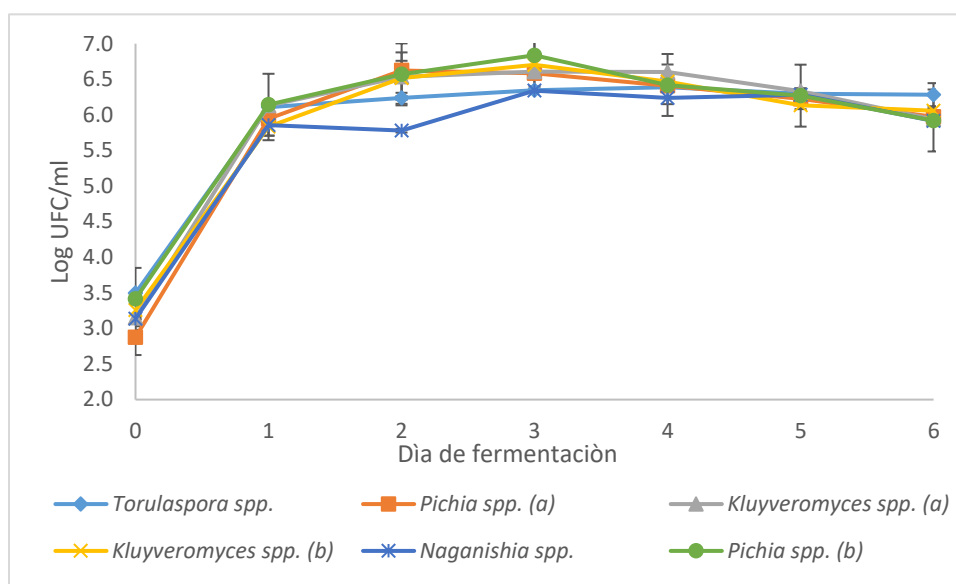


Figura 5. Viabilidad celular a 150 rpm.

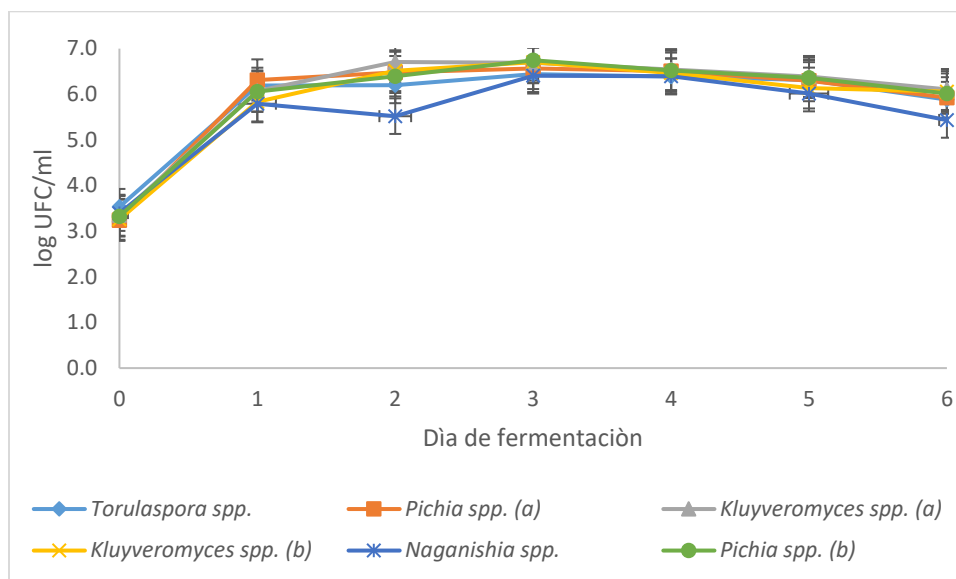


Figura 6. Viabilidad celular a 0 rpm

8.2.4 Consumo de Fructosa

Se observa que en ambas condiciones se consume la fructosa (figura 7 y 8) , sin embargo a 150 rpm la velocidad de consumo disminuye a partir del día 4, sin agitación se muestra una velocidad casi constante de consumo de azúcares, en el día tres se observa que se han consumido alrededor de 15 g/L de fructosa, por lo cual se estima que la producción de etanol sea mayor a partir de éste día.

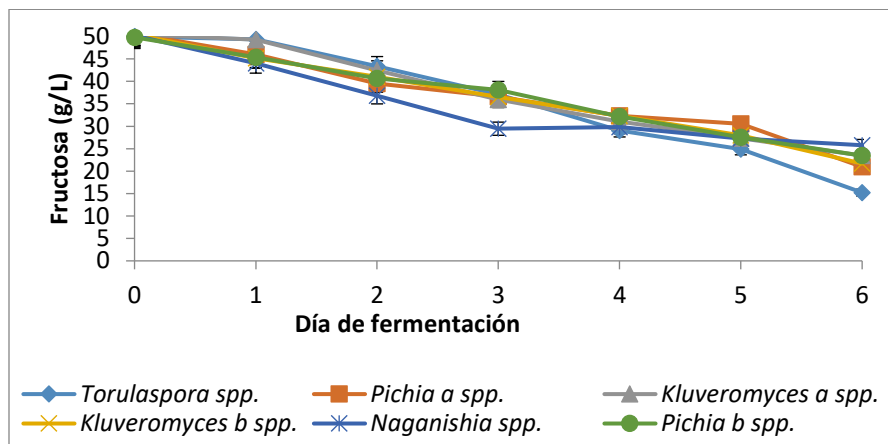


Figura 7. . Evolución del consumo de fructosa a 150 rpm

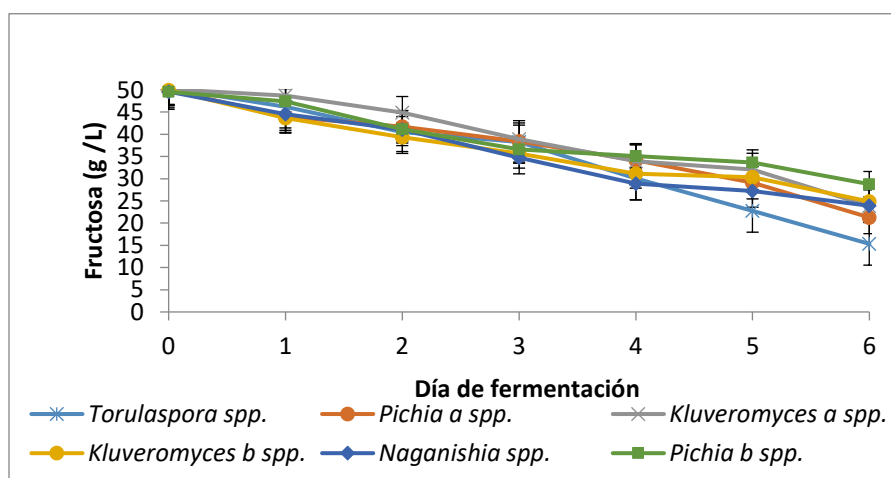


Figura 8. Evolución del consumo de fructosa sin agitación

8.2.5 Concentración de etanol

La primera etapa de cuantificación se realiza para determinar cual de los últimos tres días de fermentación es idóneo tomar como punto final de la fermentación, se observa en ambos casos que el día 5 de fermentación es donde se expresa la mayor concentración de etanol (fig 9 y 10), con excepción de *Kluveromyces* spp. (b) la cual disminuye sin agitación, a 150 rpm se alcanza una concentración máxima de, a pesar del consumo de fructosa por encima del 50% , menos del 5% se ha convertido en etanol, se conoce que las levaduras utilizan los carbohidratos no solo para transformarlos a etanol , sino para la plasticidad de sus células y los convierte en reservas de glucógeno (Hernández Padilla, 2006), en condiciones de

aireación las levaduras convierten su metabolismo de fermentativo a oxidativo, lo que genera velos encima del medio de fermentación, como se puede observar en la ilustración 1, de aspecto blanquecino y rugoso, el cual al ser agitado el matraz

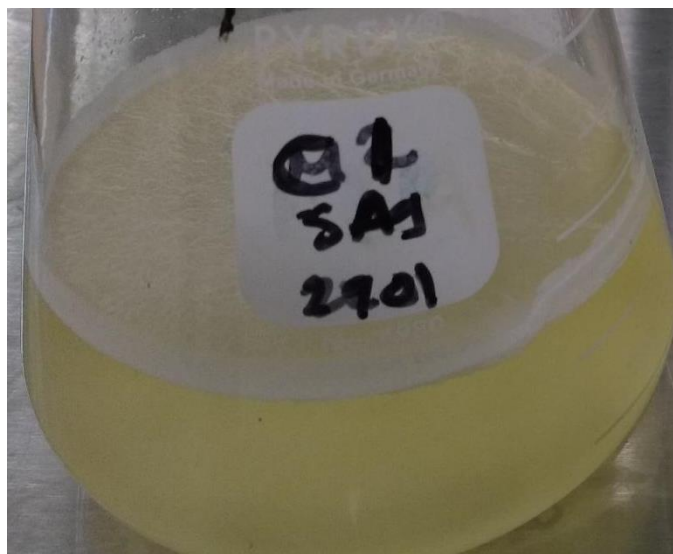


Ilustración 1. Velo oxidativo generado por la levadura en el medio de fermentación.

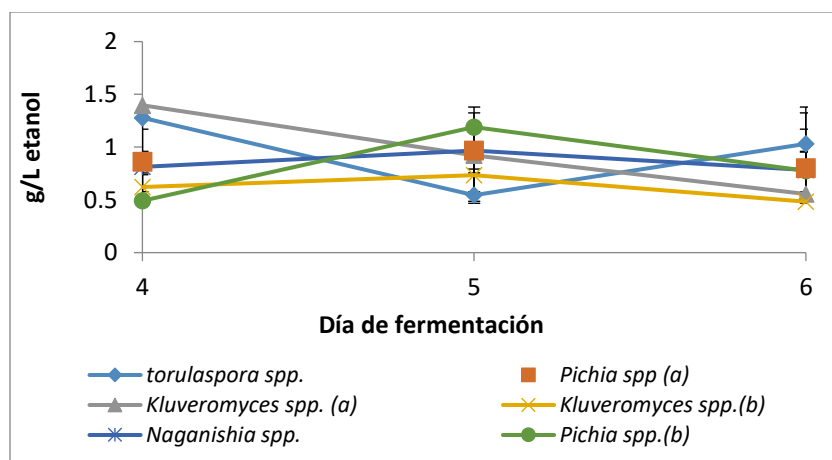


Figura 9. Producción de etanol a 150 rpm los días 4-6

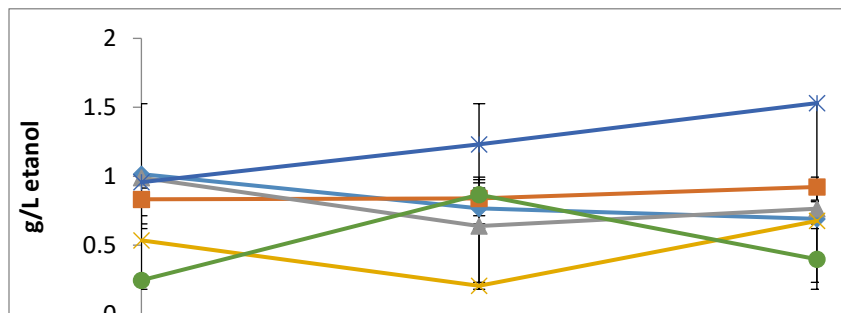


Figura 11. producción de etanol sin agitación días 4-6

8.3 Análisis de datos

Se determinó el nivel de significancia de la agitación de pH, consumo de azúcares reductores de los días 0-6 de fermentación, además de la evaluación de etanol los días 4-6. Lo anterior implica un total 33 variables o factores, con 24 observaciones por variable. El anexo III muestra los parámetros significativos estadísticamente (con un valor de P menor de 0.05). La agitación afecta significativamente el pH día 1, sin embargo al interaccionar agitación con cepa el pH en el 5 y 6d, así como la DO en el 4d, son significativas.

Al correrse un ANOVA (anexo III) solamente en términos de etanol, en referencia a la cepa y agitación, no hay una diferencia significativa de producción de etanol tanto por cepa como por condición de agitación, por lo cual para los tres experimentos finales, se decide correr la fermentación sin agitación, lo cual es una ventaja tanto operacional como en términos de propiedades del fermento, ya que como se explica en secciones anteriores, la aireación en levaduras que son preferentemente anaeróbicas conduce a la formación de un velo oxidativo que genera olores indeseables además desviar el metabolismo de fermentativo a oxidativo, lo que las vuelve menos productivas de etanol, éste mismo estrés provoca que haya reservas de glucógeno dentro de la levadura, lo que también puede ser la causa de que la producción de etanol sea por debajo de los 2 g/L

A continuación se muestran los gráficos individuales de los géneros *Pichia spp.* y *Kluyveromyces spp.* para una mejor observación de los comportamientos entre las dos cepas utilizadas en el experimento.

8.4 Comparación entre cepas de *Pichia spp.* y *Kluyveromyces spp.*

8.4.1 *Pichia spp.*

La imagen es una comparación entre los resultados obtenidos de las dos cepas de *Pichia spp.* (a) y (b) , el comportamiento aunque similar, tiene puntos interesantes a resaltar como el pH de la cepa (b) mostrada en la figura 12 a 150 rpm al quinto día de fermentación, ya que es el punto más ácido del proceso, así como su pH más alcalino el mismo día en condición estática, lo cual podría sugerir un comportamiento facultativo para producción de ciertos compuestos. La cepa (a) mostrada en la figura 11, presenta una aparente uniformidad de pH con tendencia ácida a partir de día dos.

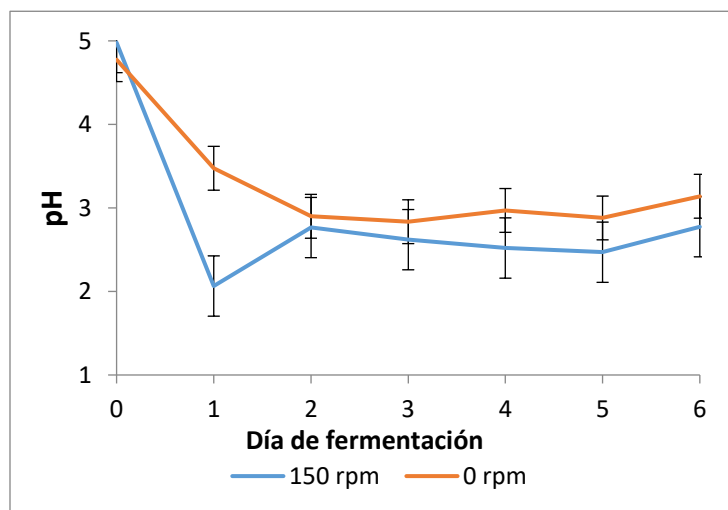


Figura 11. Evolución de pH *Pichia spp.* (a)

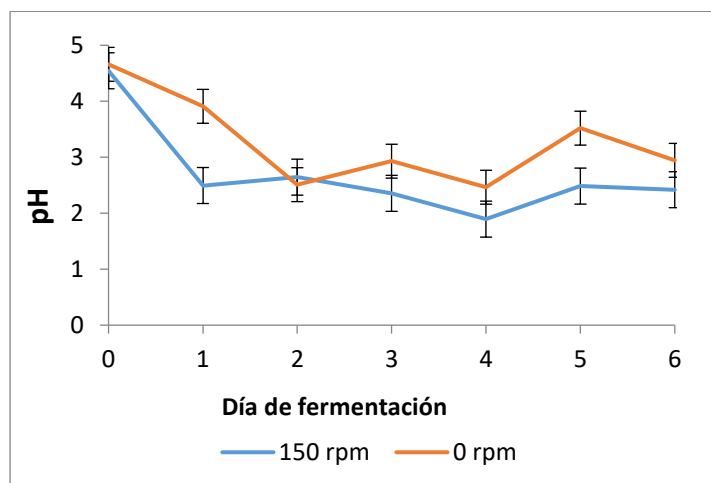


Figura 12. Evolución de pH *Pichia spp.* (b)

La densidad se comporta de manera similar en cuanto a las condiciones y cepa se trata, sin embargo a la cepa a en condición estática le toma más tiempo alcanzar una fase estacionaria, por lo que la alcanza cerca del día 2, en desventaja con la fermentación bajo agitación la cual la alcanzó pasadas las 24 horas, sin embargo se extiende hasta el día 2, la cepa b decrece a partir del día 4, alcanzando a mayor velocidad la fase estacionaria bajo agitación.

Las figuras 13 y 14 muestran una comparación entre condiciones y cepas respecto a la evolución de densidad óptica, el comportamiento es similar entre cepas en ambas condiciones el punto máximo es en el día 4.

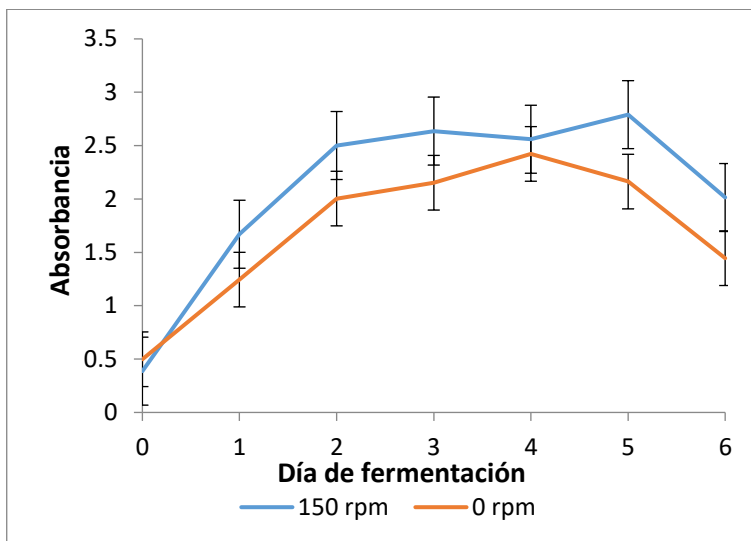


Figura 13. Evolución de densidad óptica de *Pichia spp.* (a)

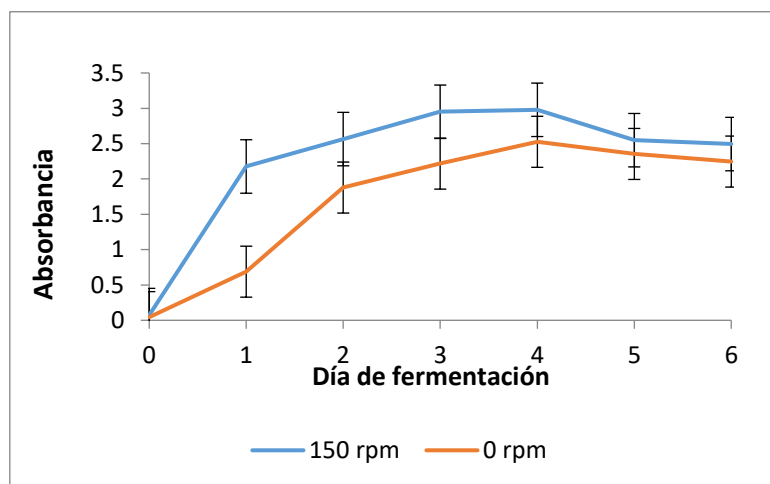


Figura 14. Evolución de densidad óptica de *Pichia spp.* (b)

Las cepas alcanzan su fase estacionaria a las 24 horas llegando a una celularidad del orden 10^6 , sin embargo la figura 17 que muestra la cepa (b) tiene un decremento mas paulatino que la cepa (a) (figura 16), hacía el día 4 la población ha disminuido.

Se observa que a 150 rpm la velocidad para alcanzar la fase estacionaria aumenta, posiblemente por la facilidad de intercambio de masa y aireación de las

células y el medio, en ambas cepas y condiciones la viabilidad celular disminuye a partir del día 3 de fermentación.

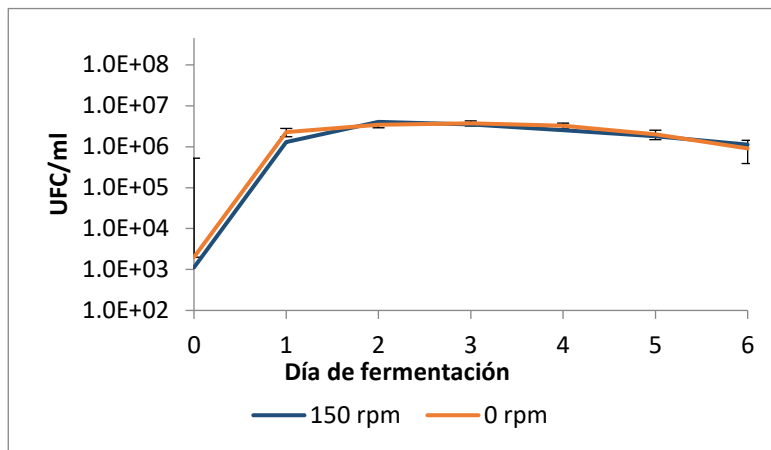


Figura 15. Viabilidad celular *Pichia spp.* (a)

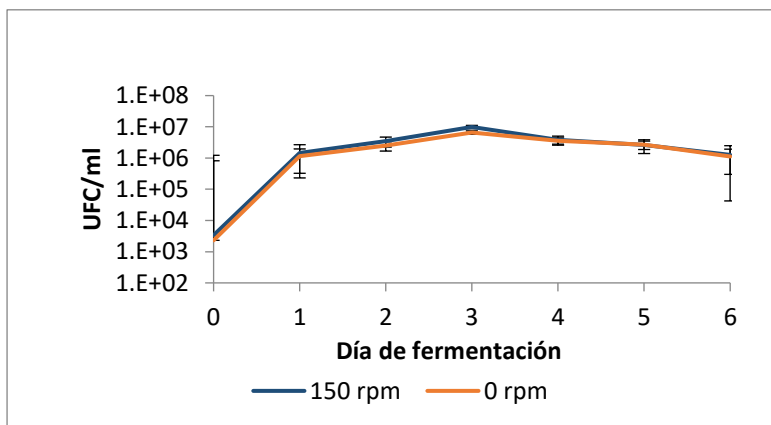


Figura 16. Viabilidad celular *Pichia spp.* (b)

El consumo de fructosa se da de manera uniforme en ambas condiciones y cepas, a partir del día 2, el consumo es más lento, y en el caso de la cepa (b) (figura 18), aumenta su velocidad al día aproximado 3 y medio a 150 rpm, siendo la condición más eficiente pues se detectan aproximadamente 22g/L de fructosa al finalizar la fermentación.

Se observa que ambas cepas tienen una alta eficiencia de consumo de fructosa, sin embargo su capacidad de consumo así como la velocidad en que se consume es mayor en condiciones de agitación, en la figura 17 se puede observar que en condiciones de agitación la cepa a tiene un ligero detenimiento en el consumo.

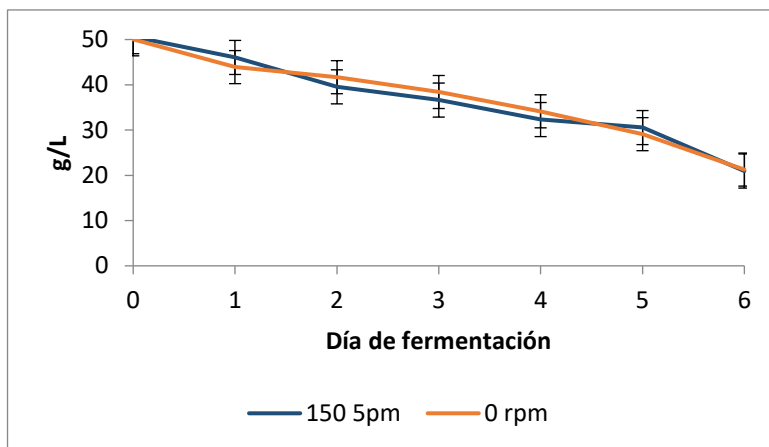


Figura 17. Evolución del consumo de fructosa por *Pichia spp.* (a)

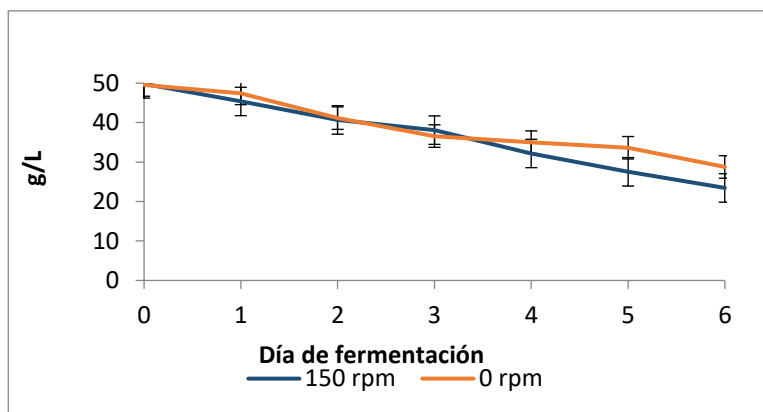


Figura 18. Evolución del consumo de fructosa por *Pichia spp.* (b)

A 150 rpm se observa una producción mayor de etanol para ambas cepas, sin embargo en la cepa a (figura 19) hay una disminución hacia el día 5, y un aumento en la condición estática, teniendo una producción final de 0.91 g/L condición estática contra 0.8 en agitación, en cuanto a la cepa (b) (figura 20), la producción

máxima de etanol en ambas condiciones fue al día 5 de fermentación , aunque al igual que la cepa (a) la producción fue mayor a 150 rpm con 1.2 g/L contra 0.8 g/L. Se observa que la cepa (a) tiene una mayor capacidad de producción de etanol en ambas condiciones, sin embargo en fermentación estática su producción se mantiene casi constante, con ligeros aumentos hacía el fin de la fermentación, la cepa b, mantiene la tendencia de aumentar en día 5 y disminuir en el día 6 de fermentación.

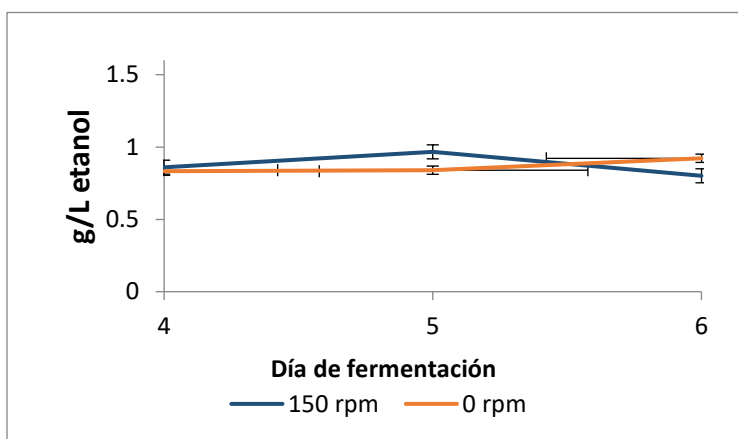


Figura 19. Producción de etanol por *Pichia spp.* (a)

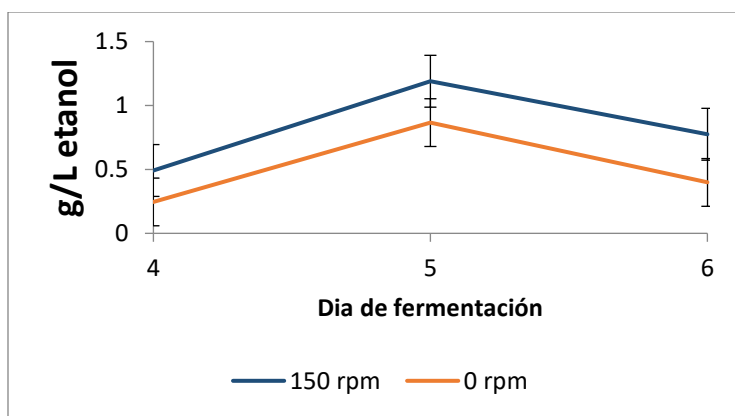


Figura 20. Producción de etanol por *Pichia spp.* (b)

8.4.2 *Kluyveromyces spp*

En ambas cepas la fermentación ocurre bajo condiciones ácidas a 150 rpm, las cuales finalizan cercano al 2.5, lo cual sugiere producción de ácidos, en condición estática el día 2 el pH se empareja a la condición de agitación, sin embargo aumenta hacia el tercer día de fermentación para terminar el proceso a pH 3.5.

Las fermentaciones estáticas se desarrollaron a pH menos ácidos que las realizadas a 150 rpm, siendo la cepa (b) (figura 232 con los valores más altos de pH a lo largo de la fermentación, se observa que terminan a pH de 2.5 y 3 respectivamente, sin embargo el comportamiento de los cambios en el pH son similares, la cepa (a) (figura 21) acidifica el medio con mayor rapidez, éste comportamiento sugiere que tiene una mayor capacidad de producción de compuestos ácidos, de los cuales el ácido acético puede estar produciéndose a partir del etanol ((Jacques-Hernández, Ramon-portugal, & Soto-cruz, 2014)

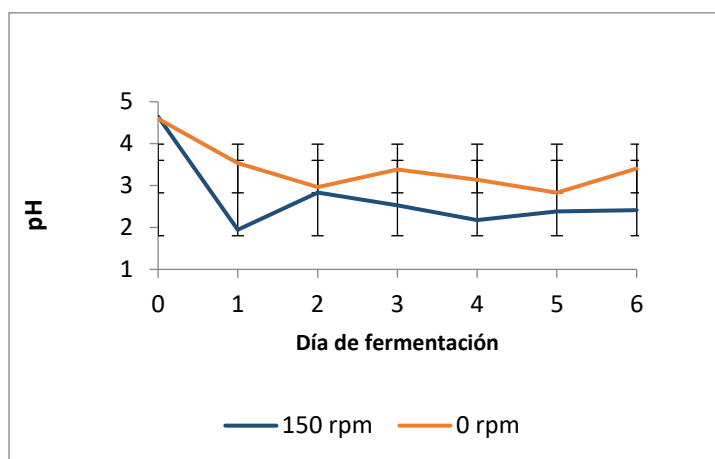


Figura 21. Evolución del pH de *Kluyveromyces spp.* (a)

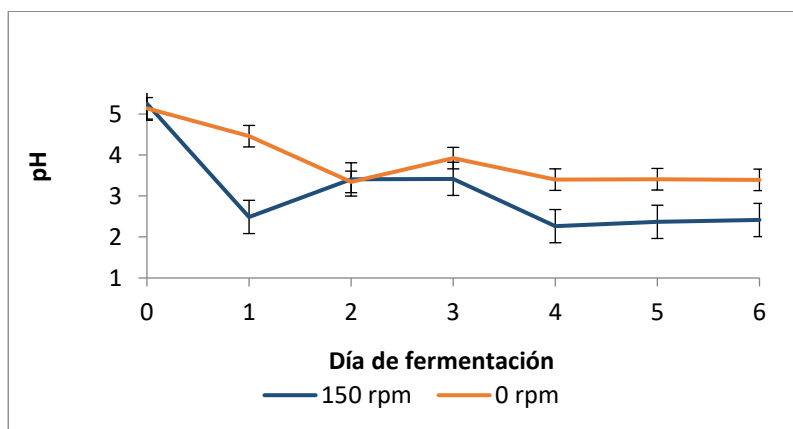


Figura 22. Evolución del pH de *Kluyveromyces spp.* (b)

La densidad óptica aumenta a mayor velocidad en condiciones de agitación, y permanecen en etapa exponencial hasta el día 4, cuando entran en fase estacionaria, la figura 23 muestra en condición estática la cepa (a) tiene dos aparentes fases exponenciales, y en ambas cepas la velocidad es menor a la condición de agitación.

La cepa a aumenta la densidad óptica a mayor velocidad en ambas condiciones, sin embargo en agitación la fase exponencial se mantiene casi constante hasta el día 4, el cual es el punto máximo y a partir del cual la densidad disminuye, en condición estática a la cepa b le cuesta más trabajo llegar al máximo. La cepa (b) mostrada en la figura 24 muestra una sola fase exponencial y al igual que la cepa a mantiene la fase estacionaria hasta el día 6 de fermentación, estos comportamientos muestran un posible supervivencia de más de los 6 días de fermentación.

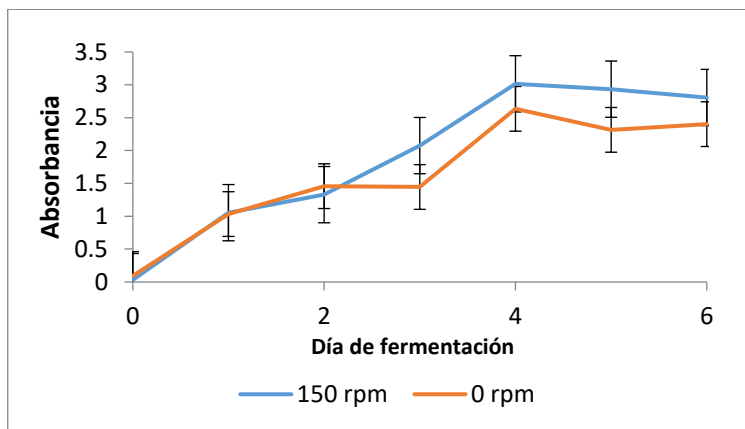


Figura 23. evolución de la densidad óptica de *Kluyveromyces* spp. (a)

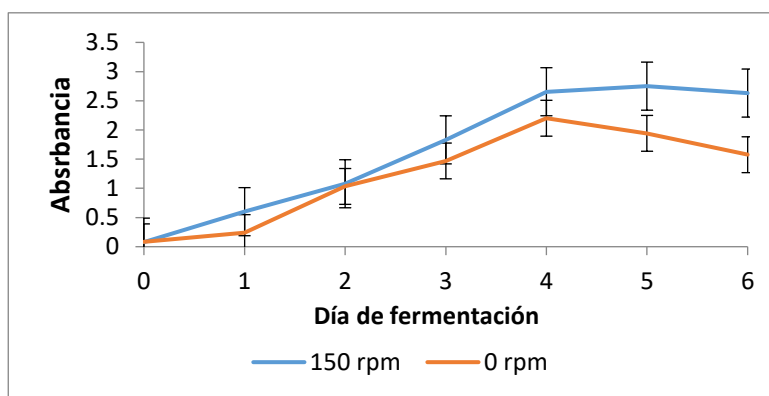


Figura 24. Evolución de la densidad óptica de *Kluyveromyces* spp. (b)

La viabilidad celular es prácticamente la misma entre las dos cepas sin embargo la cepa (a) (figura 25) es más veloz en su etapa exponencial, llegan a su máxima concentración en un orden de celularidad de 10^7 aproximadamente en el segundo día de fermentación, para disminuir hacia el final de la fermentación.

A 150 rpm las cepas de *Kluyveromyces* llegan a la fase estacionaria con mayor rapidez que en condiciones estáticas, sin embargo la tendencia del crecimiento celular es similar, con un máximo de celularidad de orden 10^7 , en condiciones estáticas las cepas entran en la etapa estacionaria a partir del día 2, mientras que a 150 rpm, la cepa (b) en la figura 26 no se observa con tanta claridad este proceso, es probable que sea por un periodo corto antes de disminuir la población celular.

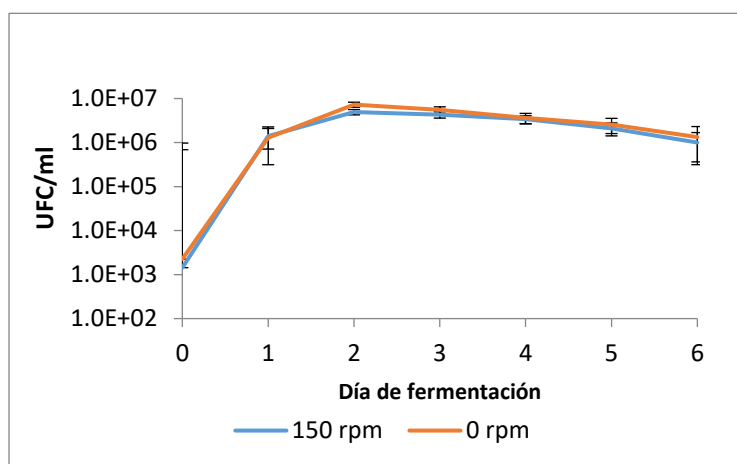


Figura 25. Viabilidad celular *Kluyveromyces spp* (a)

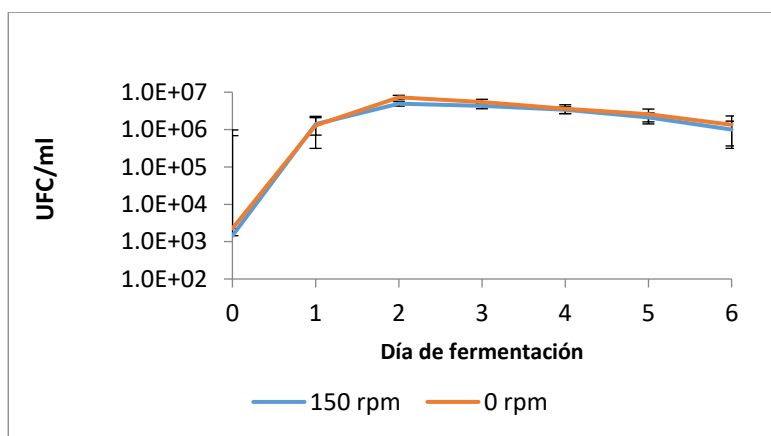


Figura 27. Viabilidad celular *Kluyveromyces spp*. (b)

La cepa b tiene una mejor capacidad de consumir la fructosa, no se observa una diferencia significativa entre condiciones de agitación en las dos cepas, al final de la fermentación la cepa (a) no consume alrededor de 22 g/L de fructosa y la cepa (b) aproximadamente 20. En condiciones estáticas de la cepa (a) inicia el consumo de fructosa a partir del día 1 de fermentación y logra consumir cerca del 50% de la fructosa en el medio.

Se observa la similitud de comportamiento en condiciones estáticas, sin embargo en la cepa (b) (figura 26) tanto la disminución al día 5 y el aumento al día 6 son

más pronunciadas, sin embargo la diferencia más interesante es en las fermentaciones a 150 rpm, las cuales difieren totalmente en comportamiento, mientras que la cepa (a) disminuye en concentración, la cepa (b) aumenta al día 5 y disminuye en el punto final.

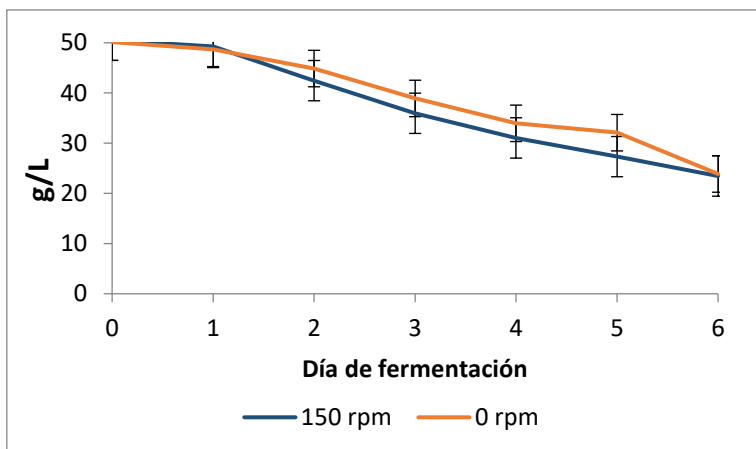


Figura 26. Consumo de fructosa *Kluveromyces spp.* (a)

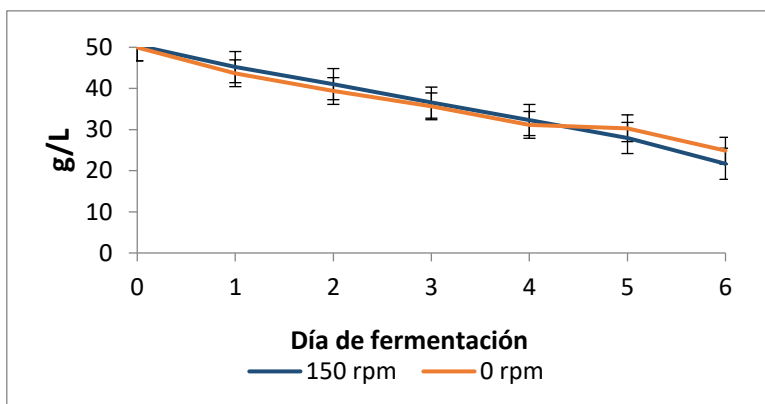


Figura 27. Consumo de fructosa *Kluveromyces spp.* (b)

A pesar que en ambos casos la producción de etanol disminuye en el día 6 , se observa que la cepa (a) (figura 30) tiene una mayor capacidad de producir etanol en ambas condiciones, sin embargo la producción de etanol no rebasa los 2g/L , Esto puede estar relacionado con el cambio de metabolismo de la levadura en

donde se oxidan los carbohidratos y ya no pueden ser convertidos en etanol ((Domínguez, 2006).

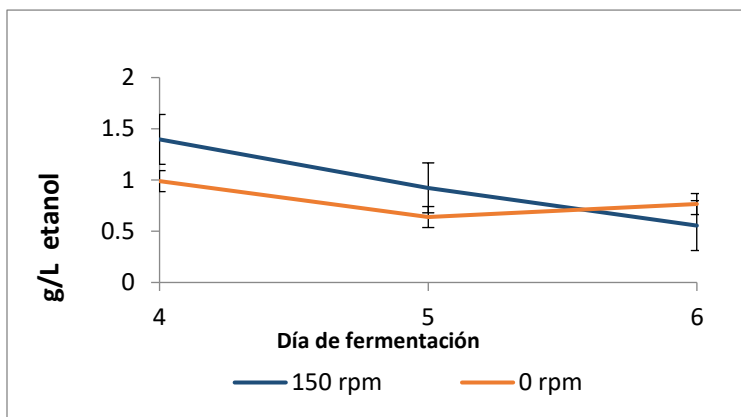


Figura 28. Producción de etanol *Kluyveromyces* spp. (a)

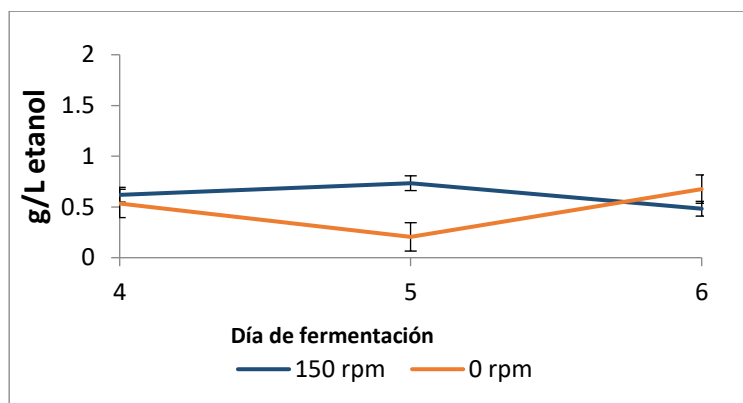


Figura 29. Producción de etanol *Kluyveromyces* spp. (b)

El análisis estadístico para la fase preliminar (anexo) fue un ANOVA con prueba de Tukey para comparación de medias, con un nivel de confianza del 95%, el cual en conjunto no muestra diferencias significativas entre los comportamientos y capacidad de producción de etanol de las seis cepas evaluadas, sin embargo en un contexto individual se muestran parámetros significativos como es el caso del pH

8.5 Fermentación de mosto de *Dasyilirion* spp. con *Kluyveromyces* spp. Cepa a y b.

Posterior al análisis estadístico en el cual la agitación no ofrece efecto significativo en cuanto a la capacidad de producción de etanol, se elige un género de levadura de acuerdo a otras características de importancia industrial, *Kluyveromyces* spp. , tiene una conocida tolerancia a cambios de temperatura, altas concentraciones de etanol (Pérez, González-Hernández, Chávez-Parga, & Cortés-Penagos, 2013), y tiene la capacidad de producir fructosiltransferasas e inulinasas en medios con presencia de inulinas (Castillo Calderón & Chamy Maggi, 2010), por lo cual se evalúan en mosto de *Dasyilirion* spp.

En la Figura 30 se muestra la diferencia de comportamiento a dos distintos tiempos de fermentación. En el día 1 y 4 de fermentación, *Kluyveromyces* spp. (a) se mantiene en un valor aproximado de 3.2 a lo largo de la fermentación con un ligero aumento hacia el 3.5 al punto final, las dos cepas alcanzan el mismo valor de pH el día 3, siendo el valor más bajo para la cepa *Kluyveromyces* spp (b), la cual fermentó a valores de pH cercanos al 4. Por lo cual se espera que los volátiles generados por *Kluyveromyces* spp. (a) sean en un buen porcentaje compuestos ácidos, los cuales se ven reflejados en los cambios de pH al estar disueltos en el medio de fermentación.

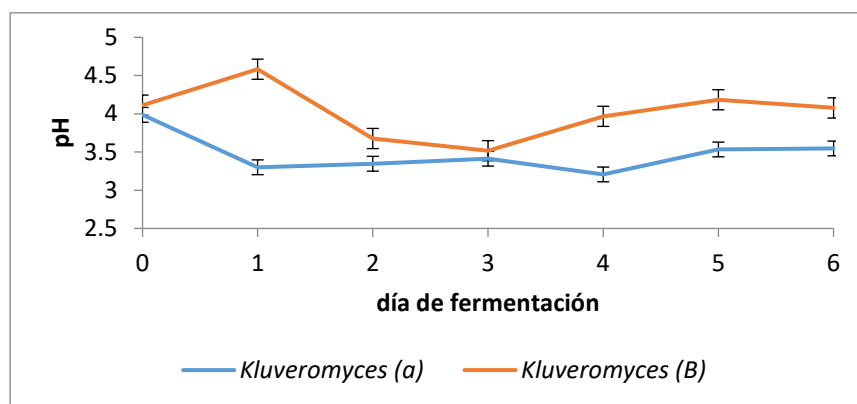


Figura 30. Evolución del pH

De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA) así como la prueba de Tukey se observa que no existe una diferencia significativa en los valores de pH entre ambas cepas (Tabla 4 y 5 ,anexo IV).

Las cepas alcanzan su fase estacionaria a las 24h en el caso de K. (b) y a las 48 en el caso de K. (a) (fig 31), ambas cepas sobrevivieron al final de la fermentación en un orden de concentración de 10^9 , lo que en cuestiones de adaptabilidad son muy similares , la glucosa es utilizada como sustrato en la respiración, la ruta metabólica de mayor producción de energía, en ella están involucradas la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. Este proceso representa la oxidación de azúcares y otros recursos carbonados en levaduras y resulta en la oxidación completa de una molécula de piruvato generando 2CO_2 , 3NADH , 1FADH_2 , 4H^+ y 1GTP , lo cual produce un aumento en la biomasa (Walker y White, 2005).

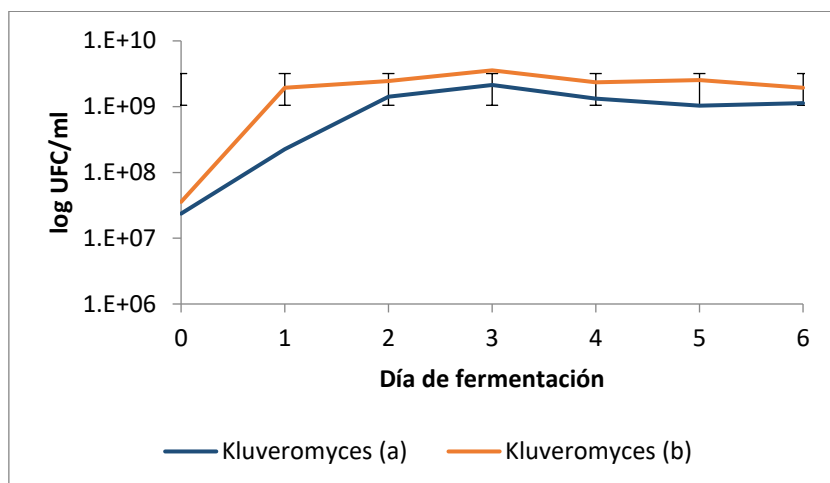


Figura 31. Viabilidad celular.

la tabla 5 muestra que no hay una diferencia significativa de manera global entre el crecimiento de las cepas, sin embargo al momento de realizar la prueba de medias en la tabla 6 son significativamente diferentes los días 1,2 y 4-6.

Tabla 5. ANOVA UFC *Kluveromyces a y b*

Fuente	GL	SC Ajuste.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	2.70914E+19	4.51523E+18	3.61	0.007
Error	35	4.37703E+19	1.25058E+18		
Total	41	7.08617E+19			

Tabla 6. Prueba de Tukey para UFC

Factor	N	Media	Agrupación	
UFC3	6	2851666689	A	
	6	1943333370	A	B
UFC2				
UFC4	6	1835000073	A	B
UFC5	6	1793333354	A	B
UFC6	6	1535000029	A	B
UFC1	6	1080000000	A	B
UFC0	6	29666667		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

La disminución de sólidos a través del tiempo es coherente con lo esperado en el proceso de fermentación (figura 31), dado que las cepas consumen los azúcares presentes en el medio y los metabolizan a especies volátiles y de reservas energéticas, como es el caso del glucógeno (Hernández Padilla et al., 2006). Se observa que *Kluyveromyces spp.* (a) tiene una mayor capacidad de procesar dichos carbohidratos en el medio (Hernández padilla, 2006).

El estadístico muestra en la tabla 19 del anexo VI que no hay diferencia significativa en cuanto a la presencia de sólidos disueltos a lo largo de la fermentación (fig. 32)

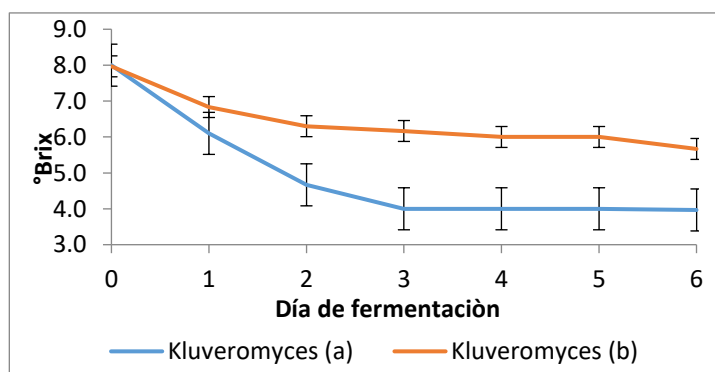


Figura 32. Sólidos disueltos en la fermentación

La figura 33 muestra que K. (a) tiene una mayor capacidad de metabolizar AR llegando al punto final con 8.64 g/L mientras que K.(b) finaliza con 22.5 g/L, coincide con el patrón mostrado en el gráfico de sólidos disueltos, lo cual puede ser sugerente de que la cepa a tenga la capacidad de fermentar una variedad mayor de azúcares fermentables que la cepa b, la cual puede estar siendo inhibida por componentes propios del mosto. El estadístico aplicado no muestra una diferencia significativa entre la disminución de sólidos disueltos

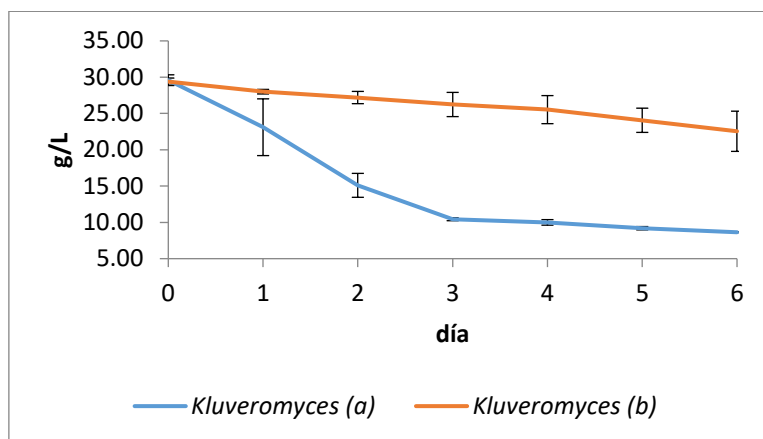


Figura 33. Consumo de AR en la fermentación

El ANOVA (tabla 7 y 8) muestra que no hay una diferencia significativa entre los AR metabolizados, sin embargo de manera individual los valores de azúcares son significativos del día 1 al 4, por lo que *Kluyveromyces* spp. (a) tiene una mayor capacidad de metabolizar los azúcares reductores presentes en el medio, y una mayor producción de etanol al final de la fermentación.

Tabla 7. ANOVA de azúcares reductores de *Kluyveromyces* a y b

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	951.4	158.56	3.29	0.011
Error	35	1686.9	48.20		
Total	41	2638.3			

Tabla 8. Prueba de Tukey de azúcares reductores

Factor	N	Media	Agrupación	
AR0	6	29.491	A	
AR1	6	25.56	A	B
AR2	6	21.15	A	B
AR3	6	18.42	A	B
AR4	6	17.79	A	B
AR5	6	16.64		B
AR6	6	15.47		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Kluyveromyces spp. (a) produce alrededor de 10 veces más etanol al final de la fermentación (figura 34), con una concentración de 2.35 g/L y 0.25 g/L para K. (b), lo cual respalda parcialmente los comportamientos de presencia de sólidos disueltos como de consumo de AR, sin embargo de los aproximadamente 20 g/L consumidos por *Kluyveromyces spp. (a)* un 11% esta siendo convertido en etanol, y sólo un 3% en el caso de *Kluyveromyces spp. (b)*, en artículos relacionados con evaluación de etanol en cepas nativas se reportan rendimientos de etanol de la diversidad de levaduras evaluadas, los más bajos se encuentran entre 0,47 y 5.4 g/L en un medio con azúcares en concentración inicial de 12.1 g/L, sin embargo hay otras con capacidad de producción de 11 g/L aproximadamente, a partir de la misma cantidad de azúcares reductores en el medio, esto demuestra que el realizar una fermentación por medio de un consorcio mejora la capacidad de producción de etanol, dado que la variedad de levaduras presentes aportan una capacidad diferente de producción de etanol y asimilación de componentes (Argote et al., 2015), las producciones reportadas en dicho estudio es similar a las obtenidas en este estudio.

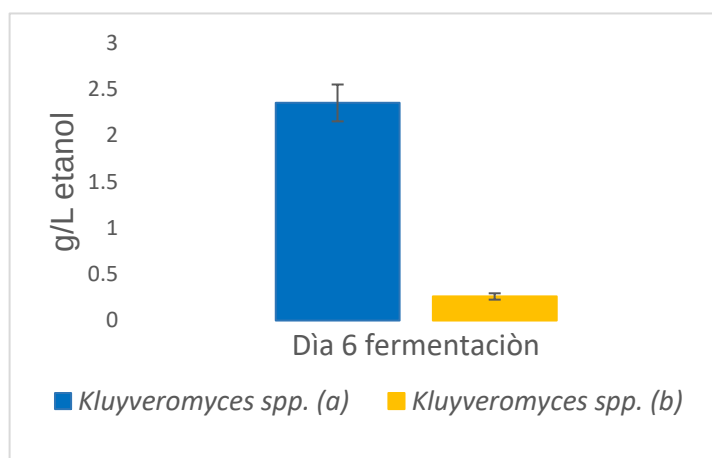


Figura 34. Producción de etanol producidas por especies de *Kluyveromyces spp.*

Con un nivel de confianza del 95% como muestra la tabla 9, para identificar la significancia de la cepas en la producción de etanol principalmente, el estadístico

muestra que *Kluyveromyces* spp. (a) tiene mayor capacidad de producción de etanol , por lo cual ésta cepa se utilizó para evaluar la fermentación en cultivo mixto.

Tabla 9. Prueba de Tukey para producción de etanol de cepas

cepa	N	Media	Agrupación
<i>Kluyveromyces</i> spp (a)	3	2350	A
<i>Kluyveromyces</i> spp. (b)	3	259.9	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

8.6 Fermentación *Kluyveromyces* spp. (a) y BAL

En base a los resultados de la sección anterior la cantidad de etanol producida por K. (a) es significativamente mayor por lo cual se evaluó la fermentación de esta cepa en conjunto con cuatro bacterias ácido lácticas (BAL) tres gram positivas y una gram negativa). Este estudio nos apoyó en evaluar los cambios en los parámetros antes descritos además de obtener un perfil de compuestos volátiles producidos tanto la levadura individual, como el cultivo mixto levadura-BAL.

La figura 35 muestra una disminución de pH paulatina y se mantiene en valores cercanos al 3.5 a lo largo de la fermentación hasta el punto final en el cual se estabiliza en pH 3, la tendencia del pH por debajo de 4 puede describir la producción de una mayor cantidad de compuestos ácidos en comparación de péptidos, los cuales pueden incluir el ácido acético (Domínguez, 2006) el comportamiento entre el cultivo puro de *Kluyveromyces* spp. (a) es similar al cultivo mixto con BAL, sin embargo hay una disminución de pH de 0.5 debido al aporte de compuestos ácidos que producen las BAL, como puede ser ácido láctico (Guardado, F. R. T., 2017).

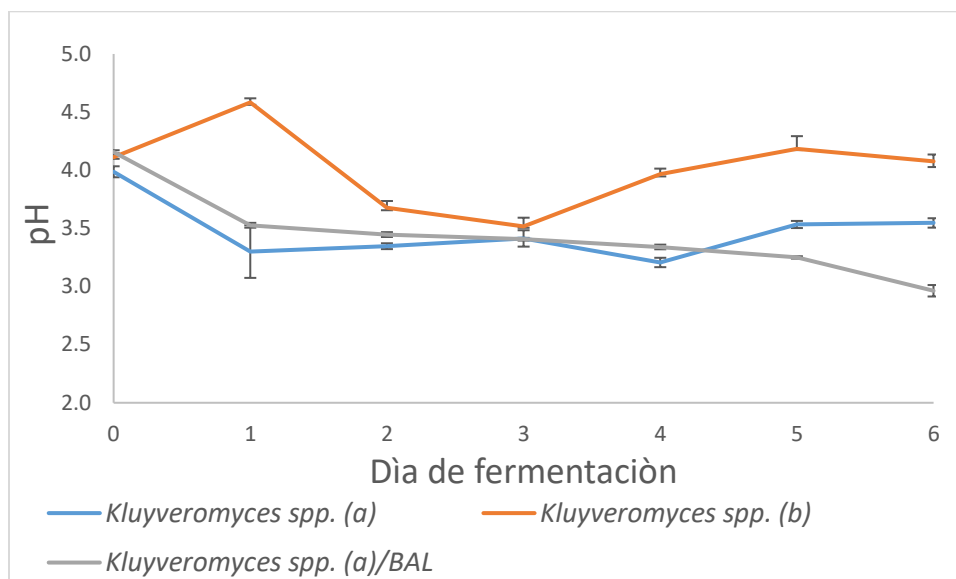


Figura 35. Evolución de pH

El orden de celularidad al final de la fermentación es de 10^8 para BAL y 10^6 para K. (a), lo cual sugiere una mayor supervivencia y resistencia de las BAL a las condiciones del medio hacia el final de la fermentación (fig 36), también puede ser una especie de inhibición (Hazas Arteaga I. N, 2012). La disminución de la población de las levaduras a partir de día 4 podría deberse a una competencia por sustrato (Guardado, F. R. T., 2017).

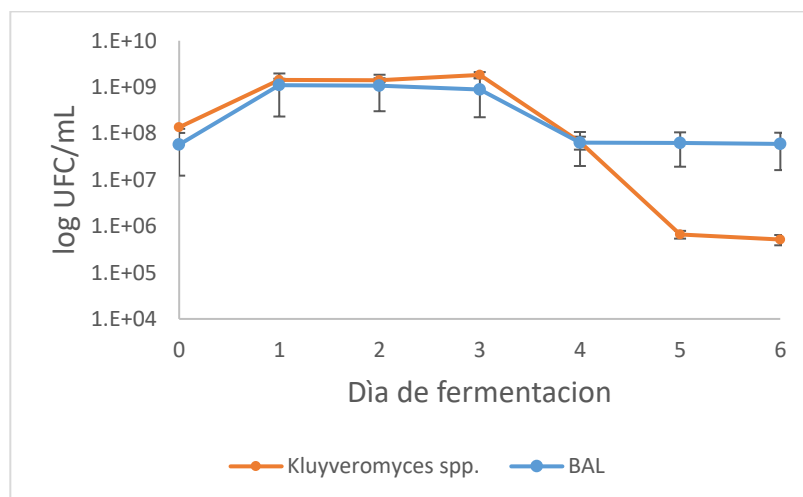


Figura 36. Viabilidad celular

En la Figura 37 se ve el rápido consumo de los sólidos disueltos hasta el día 3, a partir del cual el consumo se ralentiza y se vuelve casi asintótico, finalizando con una media de 3.8°Brix, aparentemente no hay una importante diferencia entre la asimilación del cultivo puro de *K.(a)* pura y mixta con BAL, lo cual es sugerente de que las BAL asimilan una concentración muy baja de sólidos disueltos.

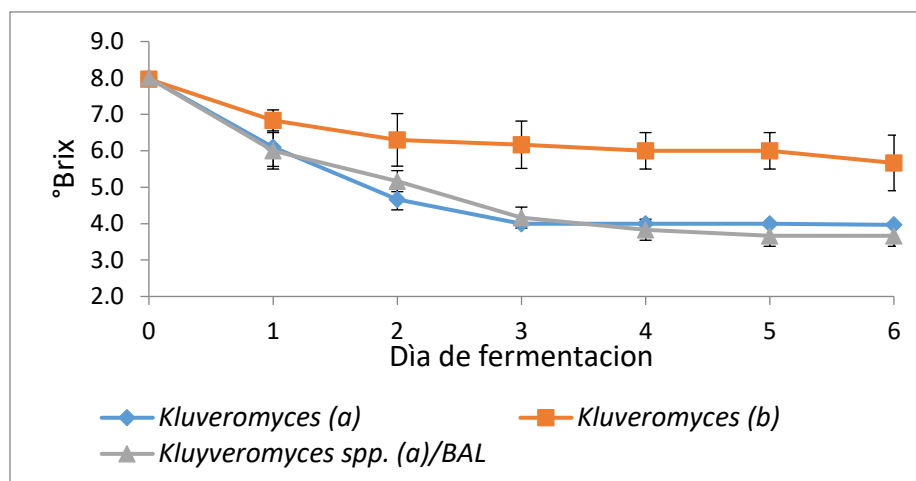


Figura 37. Sólidos disueltos a través de la fermentación

Se observa que en las primeras 48 horas se consume más del 50% de los AR disponibles en el medio de fermentación (figura 38), y consumen con mayor dificultad los aproximadamente 10 g/L restantes del medio, dejando un residual de 4 g/L, lo cual sugiere que al ser combinadas las levaduras y BAL aumenta la velocidad consumo y capacidad de metabolización de AR, se espera que haya una producción de etanol similar a la producida por *K. (a)*, el cultivo mixto consume aproximadamente 5 g/L más de AR, lo cual puede mostrar en términos de azúcares reductores que las BAL consumen menor cantidad de AR, sin embargo provoca que la velocidad de consumo aumente, los azúcares residuales del cultivo mixto son cercanos a 4 g/L mientras que el cultivo puro de *K.(a)* cercanos a 9 g/L, por lo cual el cultivo mixto logra consumir un 86% de los AR del medio.

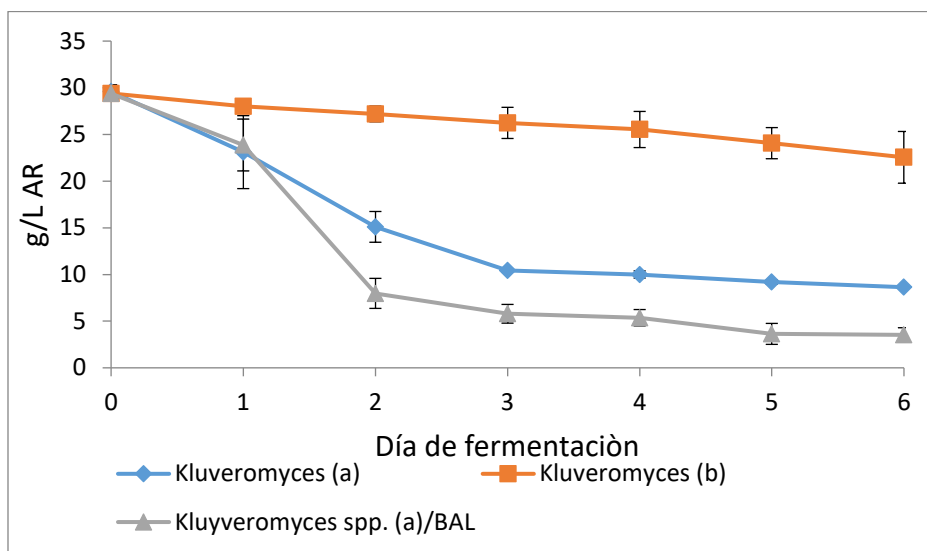


Figura 38. Consumo de AR a través de la fermentación

Sin embargo al evaluar la producción de etanol (fig 39) nuevamente se muestra que un bajo porcentaje de los azúcares fermentables son convertidos a etanol (6%), y disminuye la concentración en el cultivo mixto, lo cual es sugerente que se están produciendo otros metabolitos como ácido acético a partir del etanol producido (Domínguez, 2006), además de otros ácidos orgánicos los cuales pueden observarse en el análisis por Head Space-SPME.

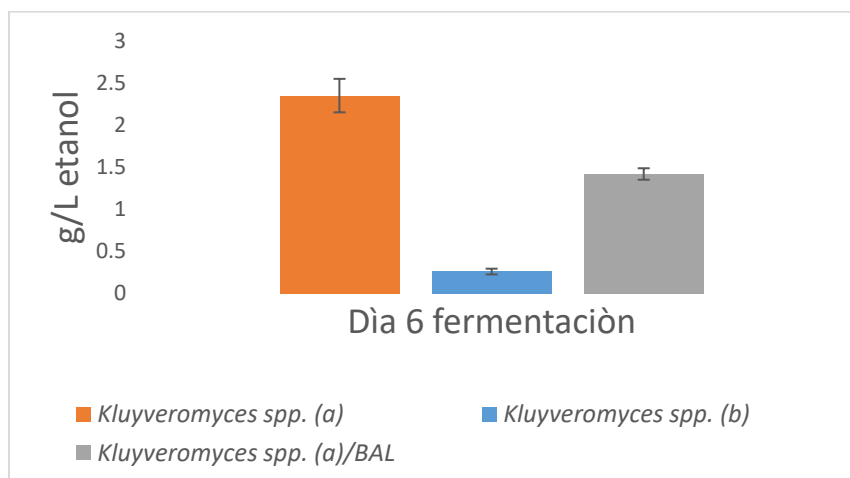


Figura 39. Producción de etanol

8.7 Análisis de compuestos volátiles en mostos de *Dasyilirion* spp.

Se realizó una evaluación de producción de compuestos volátiles por los diferentes mostos, es decir, se analizaron tanto el mosto sin fermentar, como el mosto fermentado por K.(a), K. (b) y el cultivo mixto de K.(a)/BAL.

El cromatograma del mosto sin fermentar en la figura 40 muestra la abundancia de la tabla 10 en porcentaje de volátiles, se detectan 39 compuestos de los cuales el benzenodimetanol fue el compuesto con porcentaje mayoritario (26%), el resto de los compuestos están por debajo del 6% en abundancia, en cuanto al tujeno detectado en dos formas orgánicas (TR =9.045 y 25.089 min), se ha reportado de aromas herbales (Ayala, L., Nicola, S., Zocarrato, I., Caro, Y., & Gómez, S. 2017).

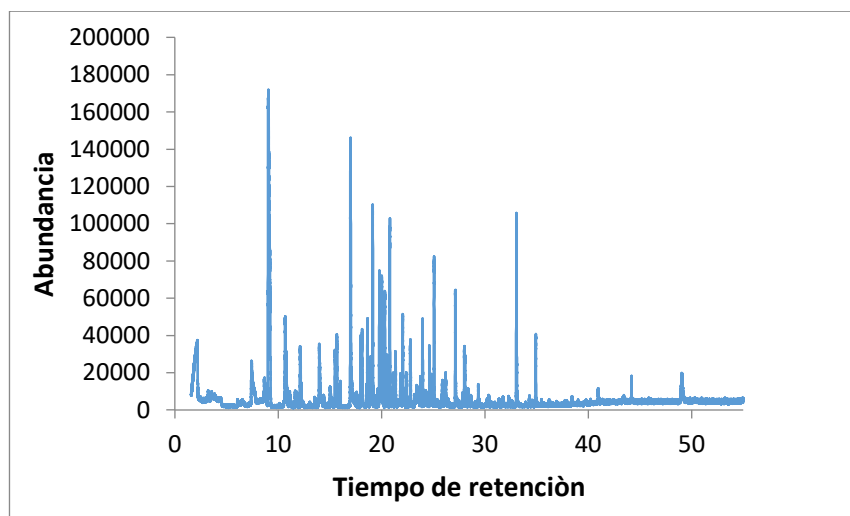


Figura 40. Volátiles detectados por HS-SPME en mosto sin fermentar

Tabla 10. Volátiles detectados en mosto previo a fermentación por técnica Head-Space-SPME

MOSTO SIN FERMENTAR				
	COMPUESTO	T.R	ABC	%

		ABUNDANCIA		
1	Hexanal	7.423	1141674	1.80
2	Hidroxibutaraldehido	8.6667	3267697	5.14
3	Tujeno*	9.045	3119412	4.91
4	Limoneno	10.68	709790	1.12
5	2-Furanopentil	12.131	1787160	2.81
6	Octanal	13.986	1746788	2.75
7	Heptanal	15.032	1115319	1.75
8	5-Metil-2-Heptanona	15.4999	706069	1.11
9	Tetrametilsilano	15.689	621479	0.98
10	Hexanol	16.013	2177136	3.43
11	2-Octanal	17.986	761383	1.20
12	Nonenol	17.992	2774716	4.37
13	Ciclopentanepropanol	18.119	512662	0.81
14	Acido Acético	18.989	451702	0.71
15	Tetrolaldehido	19.143	992956	1.56
16	Decanal	19.29	1473436	2.32
17	Acido Nonionico	20.146	1380076	2.17
18	Tujeno*	20.32	3767629	5.93
19	Fenilsulfinilhidrazina	20.541	1239444	1.95
20	1-Pentanol-5 Ciclopropilideno	20.803	5717485	9.00
21	Acido Antranílico	21.127	646124	1.02
22	Octenol	21.346	786918	1.24
23	3,4 Pentadienal	21.848	785751	1.24
24	Beta Pineno	22.053	437630	0.69
25	1,1 Dodecadieno	22.791	347350	0.55
26	Tricarbonil Iron	23.414	1445497	2.27
27	3,7 Dimetil Propionato 1,6 Octadien-3-OL	23.784	497449	0.78
28	Octanal	23.973	949309	1.49
29	Mircenol	24.641	5700752	8.97
30	Gamma Caprolactona	24.824	1597064	2.51
31	4,10 Tujeno	25.089	1653053	2.60
32	Metilenbenciclo 5,1 Octano	25.887	1145382	1.80
33	Dimetil Silanediol	26.207	930075	1.46
34	2,4 Decadienal	27.045	813114	1.28
35	Acido Hexanoico	28.019	3278980	5.16
36	Tolueno	29.375	402033	0.63
37	1,5,9 Decatrieno	33.058	358492	0.56
38	Benzenodimetanol	34.924	16794248	26.42
39	Beta.D Glucopiranosida, Metil 3,6 Anidro	49.063	3119461	4.91
TOTAL DE ABUNDANCIA		63558786		

La figura 41 muestra el cromatograma de la detección de los compuestos volátiles del mosto fermentado por *Kluyveromyces* spp. (a)., la tabla 11 muestra 40 compuestos de los cuales el mayoritario en porcentaje corresponde a la aziridina (46.21%), a diferencia del mosto sin fermentar también muestra un 31.36% de 2-propanona, 1,1,1,3,3,3-hexafluoroacetona o-nenziloxima, así como un 11.67% de aceite de fusel, los demás compuestos son menores al 4%, se observa una alta concentración de aceite de fusel (furfural), el cual se forma en fermentaciones a pH bajo y una limitación de nitrógeno en el medio, el cual es bajo en el mosto, también la hexafluoroacetona o 2-propanona (cetona), la cual posiblemente se convierta en uno de los marcadores del sotol (2-n butanona). (López Pérez & Guevara Yáñez, 2001). Además del etanol, en la fermentación alcohólica se detecta la presencia de alcoholes superiores como el isobutanol, acetato de isoamilo y etilo, además del ácido acético y compuestos furfúricos como el aceite de fusel pueden ser formados a partir del ácido pirúvico, los cuales disminuyen a través de la fermentación, un buen porcentaje de los ácidos orgánicos como el ácido decanoico son producidos durante la vía de síntesis de los ácidos grasos a partir de la malonyl-Coenzima (Hidalgo, Yasser, Hatta, Beatriz, & Palma, Juan Carlos. 2016), el cual es dependiente de la cantidad de azúcares presentes, y consecuentemente del piruvato formado el cual se convierte en acetil-CoA y después da paso a los ácidos grasos más coenzima A (Pozo-Bayón, M.A., Pueyo E., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C. 2001).

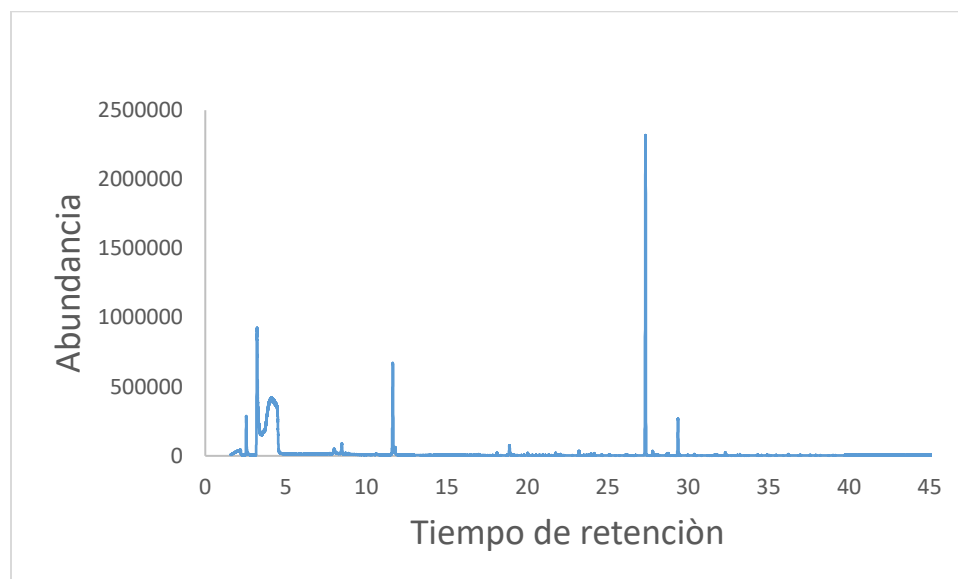


Figura 41. Cromatograma de HS-SPME con *Kluyveromyces spp.* (a)

Tabla 11. Volátiles detectados en mosto fermentado por *Kluyveromyces spp.* (a).

	COMPUESTO	T.R	ABC	%ABUNDANCIA
1	Aziridina	3.215	93194572	46.21
2	Isobutanol	8.005	1857947	0.92
3	Acetato De Isoamilo	8.482	2014427	1.00
4	Biciclo(6.1.0.)Non-1-Eno	8.905	267313	0.13
5	Aceite De Fusel	11.656	23543374	11.67
6	Ácido Acético	18.899	2411266	1.20
7	3-Metil-1,5 Pentanediol	19.802	90337	0.04
8	Propanatiol	20.043	273600	0.14
9	1,2-Ciclooctadieno	20.32	89408	0.04
10	Fenilazopiridina, PAB	20.552	100691	0.05
11	Hirazina,1,2-Difrmil	20.795	128317	0.06
12	Lactamida,Acido Lactico Amida	20.981	142054	0.07
13	1,2ciclopentaneiol, Trans	21.353	138054	0.07
14	Propanamida,Lactamida	21.908	93581	0.05
15	Biciclo(5.1.0)Octano,8-Mwtileno	22.079	259140	0.13
16	Benzil Metil Ulfoxida	23.227	902293	0.45
17	2-Etil-2-Metil1,3-Propanediol	23.532	66796	0.03
18	1-Heptamina,	23.78	75422	0.04

19	1-Propanatiol	23.973	255732	0.13
20	Acido Hexanoico,Alfametikcaproico	24.169	467153	0.23
21	Biciclo(5.1.0)Octano,8-Metileno	24.647	134013	0.07
22	Spiro(4.4)Non-1-Nona	25.091	189868	0.09
23	2-Propanona,1.1.1.3.3.3-Hexafluoroacetona O-Nenziloxima	27.356	63317498	31.39
24	Acido Decanoico	27.794	805662	0.40
25	3,4-Dihidroxi-5-Metil-Dihirofurano-2-Ona	28.02	186718	0.09
26	Metilpentol Carbamato	28.084	103820	0.05
27	Vinilisopentil Eter / Butano,1-Etenyloxy-3-Metil	28.181	58964	0.03
28	Acido Propanoico	28.375	1014568	0.50
29	Benzil Isopropil Cetona /2-Butanona,3-Metil-1-Fenil	28.666	286870	0.14
30	Sulfoxio, Benzilmetil/ Benceno (Metilsulfinimetil	28.757	379128	0.19
31	Tolueno	29.375	7243249	3.59
32	Eter Benzil Brooetil/	29.959	66855	0.03
33	E-11,13-Tetradecadien -1-Ol	30.381	180349	0.09
34	2-Furametanol,Tetrahidro-5-Metil-,Tran	31.68	163635	0.08
35	1,4ciclohexdienno,1-Metil	31.769	72880	0.04
36	2,2imetil-4-3 Metil-2-Butenil-6-Metilenociclohexil-Metanol	31.854	57961	0.03
37	1-Metileno-2b-Hidroximetil-3,3-Dimetil-4b-3metilbut-2-Enil-Ciclohexano	32.308	656242	0.33
38	Acido Propanedioico	34.311	93504	0.05
39	Norpseudoefedrina	34.926	72083	0.04
40	Acido Propilmalonico	36.221	231912	0.11
TOTAL ABUNDANCIA		201687256		

La figura 42 muestra el cromatograma de los compuestos detectados en el mosto fermentado por *Kluyveromyces* spp.(b), la tabla 12 muestra un total de 28 compuestos de los cuales el tolueno es el mas abundante con un 30.36 % de abundancia seguido por el ácido isovalérico (17.94), aparece un 6.9% de ciclohexano y un 5.37% de etilacetato uno de los ésteres más importantes ya que brinda un aroma afrutado (Hidalgo, Yasser, Hatta, Beatriz, & Palma, Juan Carlos. 2016), los demás compuestos están por debajo del 5% en abundancia, se encuentra el alcohol isoamílico o 3-metilbutanol de aroma afrutado y aplanado, el cual es uno de los alcoholes superiores mas importantes junto con el isobutanol

(alcohólico), éstos son el producto del metabolismo secundario de las levaduras, y se producen en altas concentraciones respecto de otros compuestos volátiles y son de gran interés por su impacto en el aroma y el sabor de la cerveza, por ejemplo (Loviso, C. L., & Libkind, D. 2019).

El compuesto volátil más abundante es el tolueno el cual se sugiere que proviene de la planta o el proceso al cual se somete, ya que este compuesto fue detectado en el mosto sin fermentar (ver Tabla 10 TR= 29.37 min). Se ha reportado que el tolueno es utilizado como fuente de carbono en procesos anoxigénicos donde la reacción inicial es la adición de fumarato al grupo metilo del tolueno, reacción llevada a cabo por la bencilsuccinata sintasa. El producto es convertido a fenilitaconil coenzima A por transferencia de CoA del succinil CoA (Molina Fuentes, Á. (2012) dicho proceso se puede observar en el anexo V. Se observa la presencia de mircenol (TR=24.69 min), el cual ha sido reportada en cerveza aportando un olor a lavanda de acuerdo al trabajo de del Río Morona, L. P. (2016).

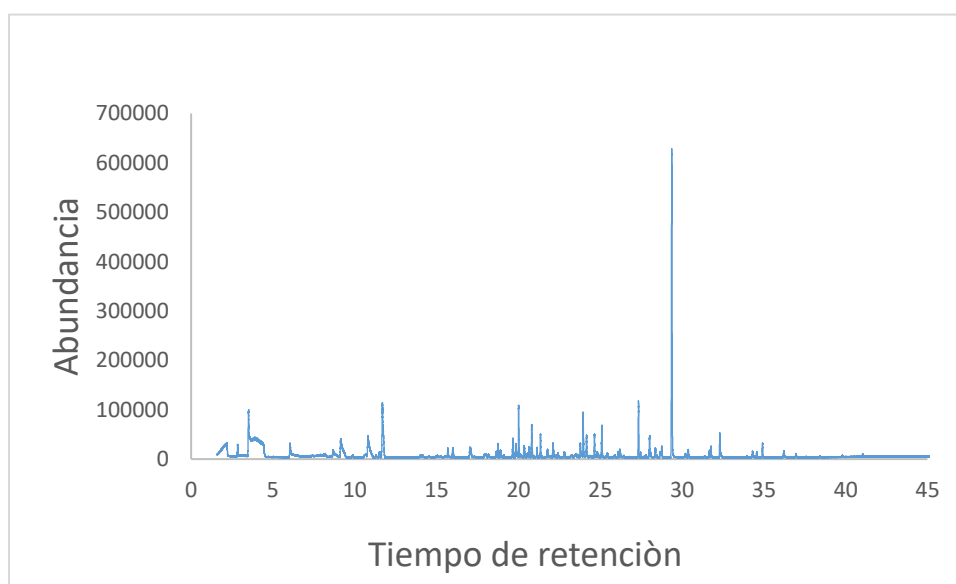


Figura 42. Cromatograma HS-SPME por *Kluyveromyces* spp. (b)

Tabla 12. Compuestos detectados en mosto fermentado por *Kluyveromyces spp.* (b)

	COMPUESTO	T.R	ABC	%ABUNDANCIA
1	Etilacetato	3.524	7068479	5.37
2	Tolueno*	6.077	5429967	4.12
3	Alcohol isopentilico	8.661	3255924	2.47
4	Ciclohexano	10.662	9090239	6.90
5	3-metil1butanol	11.778	11833908	8.98
6	2-heptanal	15.038	651356	0.49
7	1-propanatiol	15.685	467611	0.35
8	Hexanol	16.002	939177	0.71
9	Acido isovalerico	23.965	23636630	17.94
10	2-metil acido hexanoico	24.16	2281706	1.73
11	Mircenol	24.647	1614645	1.23
12	Gama caprolactona	24.828	556628	0.42
13	Trimetileter	26.208	1077235	0.82
14	Hexafluoropropanona	27.335	4145863	3.15
15	Tetrametilsilano	27.473	257918	0.20
16	Ciclopropeno	27.814	273491	0.21
17	Acido hexanoico	28.018	3386158	2.57
18	Acido propanoico	28.375	3215150	2.44
19	Benziletilcetona	28.669	1435007	1.09
20	Tolueno*	29.375	40004680	30.36
21	Acido heptanoico	30.211	558759	0.42
22	Gama-n-amilbutirolactona	31.674	841583	0.64
23	2-metil-1exen-3-ieno	31.764	1121438	0.85
24	Acido octanoico	32.312	3938842	2.99
25	Acido nonanoico	34.309	1194978	0.91
26	Nitrobencenometanol	34.924	1917260	1.46
27	Acido decanoico	36.221	1092892	0.83
28	Ciclopentano	930.39	462412	0.35
TOTAL DE ABUNDANCIA			131749936	

La figura 43 Muestra el cromatograma de los compuestos producidos por el cultivo mixto de *Kluyveromyces spp.* (a) /BAL, la tabla 13 muestra solamente cuatro compuestos detectados, de los cuales al realizar el cálculo el etanol es el mayoritario (64.7%), seguido del ácido acético (30.2%), sin embargo el cromatograma muestra una mayor abundancia de ácido acético que de etanol, el

compuesto con menor presencia fue el decanol. A diferencia de los anteriores mostos la adición de BAL a la fermentación aumenta la concentración de ácido acético, sin embargo es el único mosto en el cual el tolueno no ha sido detectado, la cantidad de compuestos se reduce drásticamente, contrario a lo que se esperaba, dado que las cepas de *Kluyveromyces* produjeron una cantidad similar de compuestos.

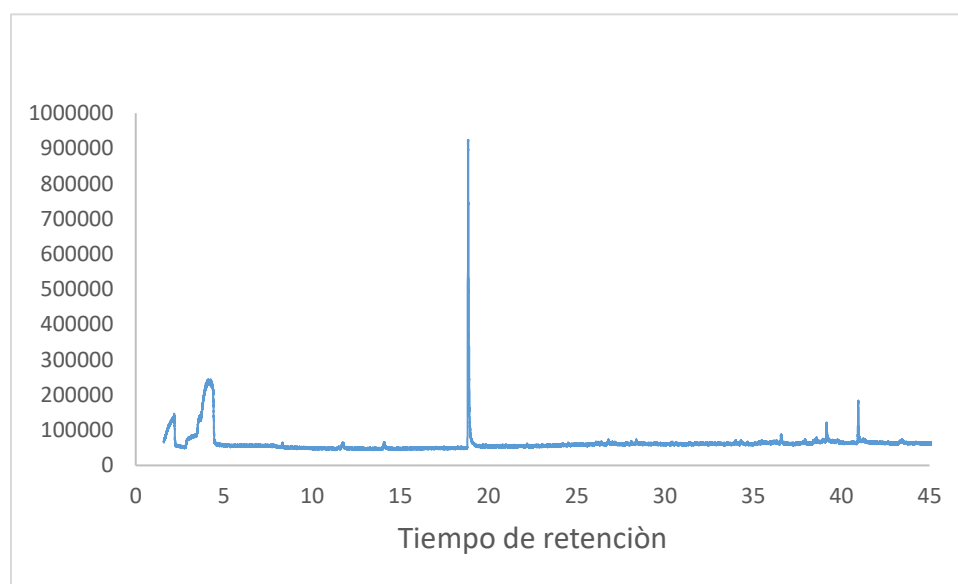


Figura 43. Cromatograma HS-SPME por *Kluyveromyces spp.* (a)/BAL

Tabla 13. Volátiles detectados en mosto fermentado por *Kluyveromyces spp.* (a)/BAL

COMPUESTO	T.R	ABC	% DE ABUNDANCIA
1 Etanol	4.11	76365187	64.60074036
2 ácido acético	18.845	36205798	30.62811011
3 Decanol	39.166	1849883	1.564899087
4 ciclopentanediol	40.964	3790141	3.206250443
TOTAL DE ABUNDANCIA		118211009	

En comparación tanto con el mosto sin fermentar, como los mostos fermentados por el cultivo puro de las cepas de *Kluyveromyces spp.*, la cantidad de

compuestos detectados en el fermento de cultivo mixto se reduce en un 89.7%, la abundancia ácido acético en el medio aumenta lo cual puede sugerir que su presencia evitó que las levaduras produjeran compuestos volátiles y por ende predominen los metabolitos producidos por las BAL, en presencia de las BAL aumenta la abundancia de acético, el cual provoca toxicidad e inhibición de producción de etanol y otros metabolitos (Ortiz-muñiz et al., 1995).

La tabla 14 muestra la totalidad de los compuestos detectados clasificados según sus grupos funcionales, así como la presencia en los mostos analizados, de manera general los mostos contienen una mayor proporción de ácidos, alcoholes, aldehídos y cetonas. Es importante mencionar que en cuestión aromática perceptible físicamente *Kluyveromyces* spp. (a) tiene una mayor predominancia de alcoholes superiores seguido de los aldehídos con un perfil aromático más afrutado, similar al tepache. La fermentación con *Kluyveromyces* spp. (b) contiene una mayor proporción de compuestos ácidos con aromas herbáceos y con un menor tono de aroma afrutados. Esto es causado por la presencia del acetato de isoamilo (Tabla 11, TR=8.48 min) detectado únicamente en el mosto fermentado con *Kluyveromyces* spp. (a) el cual es formado por la esterificación del alcohol isoamílico y ácido acético éste compuesto brinda un aroma a plátano y es sumamente penetrante (Loviso, C. L., & Libkind, D. 2019). Además el acetato de etilo es un metabolito industrialmente valioso en alimentos, ya que suele utilizarse tanto como saborizante y aromatizante (Martínez, Y. M., Aguilar, I. G., Bello, N. L., & Pérez, M. C. M. 2011).

Tabla 14. Clasificación de volátiles detectados

COMPUESTO	T.R	Mosto sin fermentar	Ka	Kb	Ka+BAL	CARACTERÍSTICA
ÁCIDOS						
Ácido acético	18.845	+	+	-	+	vinagre
Ácido antranílico	21.127	+	-	-	-	



Ácido propanóico	21.771	-	+	+	-	frutal, acido, floral
Ácido isovalérico	23.965	-	-	+	-	rancio
2-metil ácido hexanóico	24.16	-	-	+	-	Levadura, sidra, seta, mantequilla
Ácido hexanóico	24.169	+	+	+	-	Levadura, sidra, seta,
Ácido decanóico	27.794	-	+	+	-	grasa ,seco, madera
Ácido propanóico	28.375	+	+	+	+	frutal, acido, floral
Ácido heptanóico	30.211	-	-	+	-	
Ácido octanóico	32.312	-	-	+	-	acido, graso, seco
Ácido nonanóico	34.309	+	-	+	-	
Ácido malónico	34.311	-	+	-	-	manzana
Ácido propilmalónico	36.221	-	+	-	-	

ALCOHOLES

Etanol	4.11	+	+	+	+	alcohol
Isobutanol	8.005	-	+	-	-	dulce, fusel
Alcohol isopentílico	8.661	-	-	+	-	
3-metil-1-butanol	11.778	-	-	+	-	dulce frutal
1-propanatiol	15.685	-	-	+	-	
Hexanol	16.002	-	-	+	-	pasto, verde, tostado
Ciclopentanepropanol	18.119	+	-	-	-	
Nonenol	18.647	+	+	+	+	
3-metil-1,5 pentanediol	19.802	-	+	-	-	
Propanatiol	20.043	-	+	-	-	
1-pentanol-5 ciclopropilideno	20.803	+	-	-	-	
Octenol	21.346	+	-	-	-	seta, tierra
1,2 transciclopentanediol	21.353	-	+	-	-	
2-etil-2-metil1,3- propanediol	23.532	-	+	-	-	
3,7 dimetil propionato 1,6 octadien-3-ol	23.784	+	-	-	-	



1-propanatiol	23.973	-	+	-	-	
Mircenol	24.641	+	-	+	-	lavanda
Dimetil silanediol	26.207	+	-	-	-	
E-11,13-tetradecadien-1-ol	30.381	-	+	-	-	
2-furametanol,tetrahidro-5-metil	31.68	-	+	-	-	
2,dimetil-4-3 metil-2-butenil-6-metilenociclohexil-metanol	31.854	-	+	-	-	
Benzenodimetanol	34.924	+	-	-	-	
Nitrobencenometanol	34.924	-	-	+	-	
Decanol	39.166	-	-	-	+	
Ciclopentaniedol	40.964	-	-	-	+	
Propanatiol	20.043	-	+	-	-	

ALDEHÍDOS

Hexanal	7.423	+	-	-	-	químico
Hidroxibutaraldehido	8.6667	+	-	-	-	
Octanal	13.986	+	-	-	-	
Heptanal	15.032	+	-	-	-	
2-heptanal	15.038	-	-	+	-	
2-octanal	17.986	+	-	-	-	
Tetrolaldehido	19.143	+	-	-	-	
Decanal	19.29	+	-	-	-	
3,4 pentadienal	21.848	+	-	-	-	
2,4 decadienal	27.045	+	-	-	-	

AMIDAS

Lactamida,acido láctico amida	20.981	-	+	-	-	
-------------------------------	--------	---	---	---	---	--



Propanamida,lactamida	21.908	-	+	-	-
Benzil metil ulfoxida	23.227	-	+	-	-
Beta.d glucopiranosida, metil 3,6 anhidro	49.063	+	-	-	-

AMINAS

Aziridina	2.543	-	+	-	-
Fenilsulfinilhidrazina	20.541	+	-	-	-
Fenilazopiridina	20.552	-	+	-	-
Hirazina,1,2-difrmil	20.795	-	+	-	-
1-heptamina,	23.78	-	+	-	-
Metilpentol carbamato	28.084	-	+	-	-
Norpseudoefedrina	34.926	-	+	-	-

CETONAS

2-pentilfurano	12.131	+	-	-	-
5-metil-2-heptanona	15.4999	+	-	-	-
Benzildeneacetona	23.414	+	-	+	-
Spiro(4.4)non-1-nona	25.091	-	+	-	-
Hexafluoropropanona	27.335	-	-	+	-
2-propanona,1.1.1.3.3.3- hexafluoroacetona o- nenziloxima	27.356	-	+	-	-
3,4-dihidroxi-5-metil- dihirofurano-2-ona	28.02	-	+	-	-
Benzil isopropil cetona /2- butanona,3-metil-1-fenil	28.666	-	+	-	-
Benziletilcetona	28.669	+	+	+	+

AROMÁTICOS

Ciclohexano	10.662	-	-	+	-
Limoneno	10.68	+	-	-	-

cítrico



1,2-ciclooctadieno	20.32	-	+	-	-	
Beta pineno	22.053	+	-	-	-	pino
Metilenbenciclo 5,1 octano	25.887	+	-	-	-	
Encil-metil.benceno	28.757	-	+	-	-	
Tolueno	29.375	+	+	+	-	

ESTERES

Etilacetato	3.524	-	-	+	-	piña
Acetato de isoamilo	8.482	-	+	-	-	banana
Gamma caprolactona	24.824	+	-	-	-	frutal
Gama caprolactona	24.828	-	-	+	-	frutal
Gama-n-amilbutirolactona	31.674	-	-	+	-	frutal

-

ÉTERES

Trimetileter	26.208	-	-	+	-	
Vinilisopentil éter	28.181	-	+	-	-	
Éter benzil bromoetil	29.959	-	+	-	-	

ALCANOS

Ciclopentano	30.39	-	-	+	-	
--------------	-------	---	---	---	---	--

ALQUENOS

Ciclopropeno	27.814	-	-	+	-	
2-metil-1exen-3-ieno	31.764	-	-	+	-	
1,5,9 decatrieno	33.058	+	-	-	-	

TERPENOS

Tujeno	9.045	+	-	-	-	
--------	-------	---	---	---	---	--

Tujeno	20.32	+	+	+	+
4,10 tujeno	25.089	+	-	-	-
1,4ciclohexdieno,1-metil	31.769	-	+	-	-

OTROS

Biciclo(6.1.0.)Non-1-eno	8.905	-	+	-	-
Tetrametilsilano	15.689	+	-	-	-
Biciclo(5.1.0)octano,8-metileno	24.647	+	+	+	+
1-metileno-2b-hidroximetil-3,3-dimetil-4b-3metilbut-2-enil-ciclohexano	32.308	-	+	-	-

9 Conclusiones

Al evaluar la capacidad de producción de etanol y compuestos volátiles de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de mosto fermentado de *Dasyilirion spp.*, se encontró que la capacidad de producción de etanol y volátiles cambia con la adición de BAL. A partir de éstos resultados obtenidos se arrojan las siguientes conclusiones:

- El análisis proximal de la piña cruda muestra que tiene un mayor porcentaje de fibra cruda que de carbohidratos, lo que significa que un porcentaje del material lignocelulósico (fibra) podría estar compuesto de inulinas. En el proceso de cocimiento se encontró que en tiempos prolongados los °Brix disminuyen, lo cual es sugerente de fenómenos de caramelización de azúcares.
- Ninguna de las seis cepas de levadura evaluadas tiene la capacidad de producir concentraciones por encima de los 2 g/L de etanol. *Torulaspora spp.* obtuvo la mayor producción con 1.74 g/L seguido por *Kluyveromyces*

spp. y *Pichia* spp., la agitación no fue un parámetro significativo en el proceso y tras un análisis estadístico se demostró que no hay una diferencia significativa en la producción de etanol.

- Las cepas de *Kluyveromyces* spp. fueron seleccionadas para posteriores fermentaciones debido a su tolerancia a grandes concentraciones de etanol, capacidad de producción de compuestos volátiles así como de producir enzimas lignocelósicas. La fermentación de mosto de *Dasyliirion* spp. con las dos cepas de *Kluyveromyces* spp. (a y b), se realizó para elegir la cepa que sería incluida en un cultivo mixto con BAL. *Kluyveromyces* spp. (a) tuvo una mayor capacidad tanto de consumo de AR, como de producción de etanol siendo ésta 10 veces mayor a *Kluyveromyces* spp. (b).
- La fermentación con cultivo mixto *Kluyveromyces* spp. (a) con BAL mostró un efecto negativo en la producción de volátiles, el cual tuvo una reducción del 87%. La concentración de ácido acético en el medio se vio incrementado afectando el metabolismo de la levadura.
- Las fermentaciones en cultivo puro no tiene una alta capacidad de producción de etanol, por lo cual no son candidatas para el proceso por si solas, sin embargo el aporte en cuanto a compuestos volátiles las vuelve atractivas a manera de utilizarlas en otra forma de cultivo, el mixto el cual también fue explorado, demuestra que al menos en presencia de las BAL utilizadas la capacidad de producción de etanol y compuestos volátiles de las levaduras se ve seriamente afectada.

10 Bibliografía



- Peña, C., & Arango, R. (2009). Evaluación de la producción de etanol utilizando cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de melaza de caña de azúcar. *Dyna*, 76(159), 153-161.
- J.Santos Sierra Tristan et al(2008). , Los sotoles (*Dasyilirion* spp.) de Chihuahua, Instituto nacional de investigaciones forestales y agrícolas y pecuarias. Folleto técnico Num 20
- Carrillo,R.R. y J.S Sierra T,(2004).Aislamiento e identificación de cepas de levaduras responsables de la fermentación del sotol.Informe final de proyecto PRECI 3279.Campo Experimental La campana. CIRNOC-INIFAP.Chihuahua,Chihuahua.
- De la Garza H.(2008).Production of a Mexican Alcoholic Beverage: Sotol, Universidad autónoma de Coahuila.
- Hernández Mota, Guadalupe(2009).Análisis metanogénico y fisicoquímico de mostos de mezcal tamaulipeco .Reynosa Tamaulipas.
- Dominguez Ibarra, María del Carmen (2006).Aislar , identificar y Clasificar levaduras de fermentación alcohólica del sotol (*Dasyilirion* spp.)Buena Vista castillo, Coahuila, Mayo.
- García Garibay Mariano,Quintero Ramírez, Lopez Murgía Canales.(2004).Biotecnología Alimentaria 5ª edición, Limusa.
- Sánchez, Marroquín Alfredo.(1961).Principios de Microbiología industrial.México D.F
- Contreras ,Robles Ricardo.(2016). Caracterización de compuestos volátiles de sotol artesanal de aldama y madera a través de las técnicas de SPME y headspace.Facultad de Ciencias Químicas.Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Lerma torres, Leslie Paola(2016). Identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras por métodos polifásicos en el mosto de sotol (*Dasyilirion* sp.) en "Potrero del Llano"Cd. Aldama, Chihuahua.
- Diario Oficial de la Federación-DOF. 2004. Norma Oficial Mexicana del Sotol NOM-159-SCFI-2004. México.



- Consejo Mexicano el Sotol. 2009. Potencial de la industria del sotol en México. Chihuahua, Méx.
- Carrillo Trueba, Lauro Antonio. (2007). Los destilados de agave en México y su denominación de origen. Ciencias 87, julio-septiembre, 40-49. [En línea]
- Vázquez, H.J, & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, investigación y tecnología, 8(4), 249-259. Recuperado en 18 de mayo de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext HYPERLINK .
- Acosta Navarrete, María Susana, López Pérez Mercedes y Miranda López Rita. (2007). El tequila, su aroma y su sabor. Ciencias 87, julio-septiembre, 50-53. [En línea]
- Gutiérrez-Coronado, M. L.* ; Acedo-Félix, E.; Valenzuela-Quintanar, A. I. industria del Bacanora y su proceso de elaboración. Ciencia y Tecnología de Alimentos 5(5) 394-404 (2007)
- Gómez-Zamora Oa*, De Jesús-Fuentes Kla , Peñafiel-López Fa y Tovar-Hernández Pa . Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 1, No. 1 (2016) 916-923
- López MG, Guevara SC. nd. Tequila, Mezcal y Sotol: Volátiles marcadores de origen y planta. Investigación y Ciencia 1:28-32.
- Reyes-Valdes, M. Humberto & Benavides-Mendoza, Adalberto & Ramírez, Homero & Villarreal-Quintanilla, J.A.. (2013). Biología e importancia del sotol (dasylirion spp). parte ii: ecofisiología, usos e interrogantes. planta. 18. 16-20.
- Ravi Valluru, Wim Van den Ende; Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects, Journal of Experimental Botany, Volume 59, Issue 11, 1 August 2008, Pages 2905–2916, <https://doi.org/10.1093/jxb/ern164>

- Spollen, W.G.; Nelson, C.J. 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of all fescue. *Plant Physiol.* 106:329-336.
- Urías-Silvas, J., Cani, P., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M., & Delzenne, N. (2008). Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and Dasyilirion spp. *British Journal of Nutrition*, 109(2), 254-261. doi:10.1017/S0007114507795338
- M. Humberto Reyes-Valdez, Adalberto Benavides-Mendoza, Homero Ramírez-Rodríguez, José Ángel Villarreal-Quintanilla. 2012. Análisis comparativo de caracteres genéticos y fisiológicos hipotéticamente relacionados con la determinación sexual en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Proyecto Conacyt CB 154682.
- Keiko Shirai Matsumoto/Frida P. Malpica Sánchez. 2013. Manual de prácticas de laboratorio. Tecnología de Fermentaciones Alimentarias. universidad autónoma metropolitana unidad iztapalapa. División de ciencias biológicas y de la salud
- Téllez-Mora, P.; Cedeño-Cruz, M. 1997. El Tequila y su elaboración. *Biotecnología* 2(2), 55-63.
- Oscar Queris Hernández. (2007). Formación de compuestos responsables del aroma y sabor de bebidas. *Ciencia y tecnología de bebidas destiladas*. IIIA.
- Diaz-Montaña, D. M., D'elia 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.
- Juan Ferrer Espinoza. 2016. Preparación y cata de vinos y otras bebidas alcohólicas. UF0849. Paraninfo.
- Álvarez-Ainza, Maritza & Garcia-Galaz, Alfonso & Ríos, Humberto & Prado-Jaramillo, Norma & Evelia, Acedo-Félix. (2015). Análisis sensorial y de

compuestos volátiles minoritarios en destilados de agave angustifolia haw (Bacanora). BIOtecnica. 17. 22. 10.18633/bt.v17i3.215.

- M. Humberto reyes-valdés¹, Adalberto Benavides-Mendoza, Homero ramírez-Rodríguez y José Angel vVllarreal-Quintanilla(2013). Biología e importancia del sotol (dasylirion spp).parte ii: Ecofisiología, usos e interrogantes. 1depto. de fitomejoramiento. 2depto. de horticultura. 3depto. de botánica..uuniversidad autónoma de nuevo león. planta año 8 no. 17
- Molina JA, Botello AJ, Estrada BA, Navarrete JL, Jiménez IL, Cárdenas MM, Rico MM.2007. Compuestos volátiles en el Mezcal. Revista Mexicana de Ingeniería Química 6 (1):41-50.
- Antonio Valiente Barderas. (2008). Historia de la destilación. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.
- Rib´ereau, G. P. (1985). New developments in winemicrobiology. American Journal of Enologyand Viticulture 36, 1-10.
- Puertas, B., Jimenez-Hierro, M. J., Cantos-Villar, E., Marrufo-Curtido, A., Carbú, M., Cuevas, F. J., ... & Ruiz-Moreno, M. J. (2018). The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. Food chemistry, 253, 227-235.
- Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A., & Randez-Gil, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between Torulaspora delbrueckii and Saccharomyces cerevisiae baker's yeast strains. Antonie van Leeuwenhoek, 84(2), 125-134. doi: 10.1023/a:1025413520192
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., . . . Suzzi, G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. International Journal of Food Microbiology, 130(3), 179-187.

- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology*, 110, 560-565.
- P. Renault, J. Coulon, V. Moine, C. Thibon, M. Bely (2016), Enhanced 3-sulfanylhexas-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulasporadelbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains *Frontiers in Microbiology*, 7 p. 293
- Raymundo Trujillo García. (2015). purificación y caracterización bioquímica de una β -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii*. Centro De Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado De Jalisco A.C.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Argote, F. E., Cuervo, R. A., Osorio, E., Ospina, J. D., & Castillo, H. S. V. (2015). Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza con cepas nativas *saccharomyces cerevisiae*. *INGRESAR A LA REVISTA*, 13(2), 40-48.
- Álvarez-ainza, M. L., Zamora-quiñonez, K. A., & Acedo-félix, E. (2010). Durante La Elaboración De Bacanora. 52(June 2009).
- Castillo Calderón, A., & Chamy Maggi, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 1, 235–245.
- Domínguez, M. del C. (2006). Aislar, identificar y clasificar las levaduras de la fermentación alcohólica del sotol (*Dasyilirion ssp.*). 46–123.
- Jacques-hernandez, C., Ramon-portugal, F., & Soto-cruz, N. (2014). Ecología de levaduras del mezcal San Carlos: Identificación y caracterización de la flora nativa. (September). <https://doi.org/10.13140/2.1.3271.8088>
- Lara, L., Fornos, J. D., Suárez, R., López, C., Rodríguez, R., & Orriols, I. (2008). UAdeC, Facultad Ciencias Químicas, Departamento de Investigación de Alimentos V. Carranza y J. Cárdenas s/n, CP 25280, Saltillo, Coahuila,

México Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA), Ourense , Galicia , España. 2008.

- López Pérez, M. G., & Guevara Yáñez, S. C. (2001). Tequila, mezcal y sotol: volátiles marcadores de origen y planta (especie de agave). Investigación y Ciencia - Universidad Autónoma de Aguascalientes, Vol. 9, pp. 28–32. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-y-ciencia-universidad-autonoma-de-aguascalientes/articulo/tequila-mezcal-y-sotol-volatil-marcadores-de-origen-y-planta-especie-de-agave>
- Ortiz-muñiz, B., Fernández-lópez, L., Jouve, C., Ma, R., Ma, O., Veracruz, T. De, ... Formando, C. (1995). EFECTO DEL pH Y DEL ÁCIDO ACÉTICO EN *S. cerevisiae* ITV01. (2), 95. PÁlvarez-ainza, M. L., Zamora-quíñonez, K. A., & Acedo-félix, E. (2010). Durante La Elaboración De Bacanora. 52(June 2009).
- Castillo Calderón, A., & Chamy Maggi, R. (2010). Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. Scientia Agropecuaria , 1, 235–245.
- Domínguez, M. del C. (2006). Aislar, identificar y clasificar las levaduras de la fermentación alcohólica del sotol (*Dasyllirion* ssp.). 46–123.
- Jacques-hernandez, C., Ramon-portugal, F., & Soto-cruz, N. (2014). Ecología de levaduras del mezcal San Carlos : Identificación y caracterización de la flora nativa. (September). <https://doi.org/10.13140/2.1.3271.8088>
- Lara, L., Fornos, J. D., Suárez, R., López, C., Rodríguez, R., & Orriols, I. (2008). UAdeC , Facultad Ciencias Químicas , Departamento de Investigación de Alimentos V . Carranza y J . Cárdenas s / n , CP 25280 , Saltillo , Coahuila , México Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA), Ourense , Galicia , España. 2008.
- López Pérez, M. G., & Guevara Yáñez, S. C. (2001). Tequila, mezcal y sotol: volátiles marcadores de origen y planta (especie de agave). Investigación y Ciencia - Universidad Autónoma de Aguascalientes, Vol. 9, pp. 28–32. Retrieved from <http://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-y-ciencia-universidad-autonoma-de-aguascalientes/articulo/tequila-mezcal-y-sotol-volatil-marcadores-de-origen-y-planta-especie-de-agave>

volátiles-marcadores-de-origen-y-planta-especie-de-agave

- Ortiz-muñiz, B., Fernández-lópez, L., Jouve, C., Ma, R., Ma, O., Veracruz, T. De, ... Formando, C. (1995). Efecto del ph y del ácido acético en s . *Cerevisiae itv01*. (2), 95.
- Paola, L., & Torres, L. (2017). Agradecimientos. 1–69.
- Guardado, F. R. T. (2017). Estudio de las interacciones bacterias ácido lácticas-levaduras en fermentación para la elaboración de una bebida alcohólica
- Hazas Arteaga, I. N. (2012). “ Selección y aplicación de un consorcio microbiano para la aceleración continua del proceso biológico de decoloración de efluentes textiles .”

Pérez, E., González-Hernández, J. C., Chávez-Parga, M. C., & Cortés-Penagos, C. (2013). (Desarrollo y aplicación de las ecuaciones de Stefan-Maxwell) Fermentative characterization of producers ethanol yeast stephen whitaker from agave cupreata juice in mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniera Qumica*, 12(3), 451–461. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v12n3/v12n3a8.pdf>

QUÍMICA DE ALIMENTOS PRESENTA : (2018).Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.). (1993). *Lactic acid bacteria* (pp. 199-225). New York, USA: Dekker. (n.d.).

- Salminen, S., & Von Wright, A. (Eds.). (1993). *Lactic acid bacteria* (pp. 199-225). New York, USA: Dekker.
- QUERIS, O. (2007). *Ciencia y tecnología de bebidas destiladas*. Rones. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, 134.
- Leslie Paola Lerma Torres (2017). Identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras por métodos polifásicos en el mosto de sotol (*Dasyilirion* sp.) en "Potrero del Llano"Cd. Aldama, Chihuahua. universidad Autónoma de Chihuahua Facultad de Ciencias Químicas.
- Ricardo Contreras Lopez(2016). Caracterización De Compuestos Volátiles De Sotol Artesanal De Aldama Y Madera A Través De Las Técnicas De Spme



Y Headspace. universidad Autónoma de Chihuahua Facultad de Ciencias Químicas.

- Francisco Rafael Torres .(2017). Estudio de las interacciones bacterias ácido lácticas- levaduras en fermentación para la elaboración de una bebida alcohólica. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Brenda Margarita Franco Diaz.(2018). Identificación De Las Levaduras Que Participan En La Fermentación Natural Para La Producción De Soto. Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- Ortiz-Muñiz, B., Fernández-López, L., Jouve, C., Oliart-Ros, R. M., & Guadalupe, M. EFECTO DEL pH Y DEL ÁCIDO ACÉTICO EN *S. cerevisiae* ITV01.
- Ayala, L., Nicola, S., Zocarrato, I., Caro, Y., & Gómez, S. (2017). *Salvia* spp. como aditivo promotor de crecimiento en dietas de conejos destetados. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 30, 61-64.
- del Río Morona, L. P. (2016). trabajo fin de grado título: producción de cerveza y efectos de un consumo moderado sobre la salud (doctoral dissertation, universidad complutense de madrid).
- Molina Fuentes, Á. (2012). Degradación anaerobia de compuestos aromáticos hidroxilados en *Azoarcus anaerobius* y *Thauera aromática* AR-1
- Hidalgo, Yasser, Hatta, Beatriz, & Palma, Juan Carlos. (2016). Influencia de la presencia de borras durante el tiempo de reposo del vino base sobre algunos compuestos volátiles del pisco peruano de uva Italia. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(3), 280-295. Recuperado en 09 de julio de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000300004&lng=es&tlng=es.
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*.

- Martínez, Y. M., Aguilar, I. G., Bello, N. L., & Pérez, M. C. M. (2011). Obtención de alcoholes superiores a partir de fusel mediante proceso de destilación Fraccionada. Centro azúcar, 38(4), 8-14.

11 Anexos

11.1 Anexo I

Los cálculos de concentración de azúcares reductores se realizaron conforme a la ecuación de la recta mostrada en la figura 46 para la cual se utilizó fructosa como monosacárido de referencia.

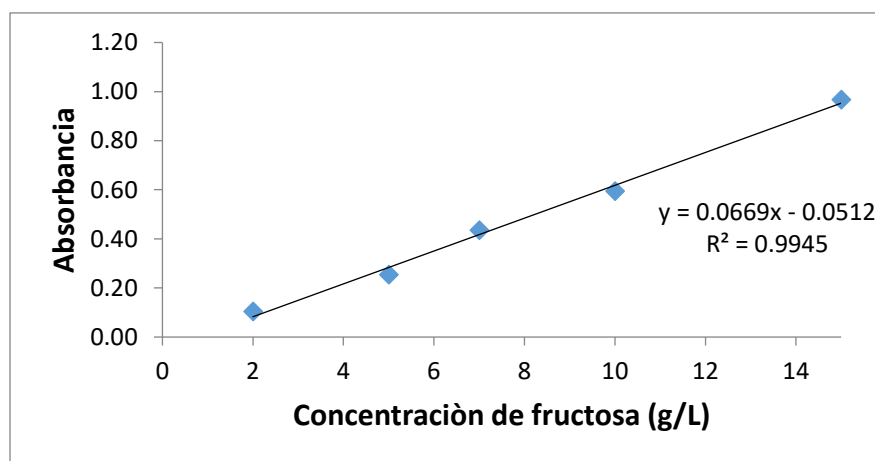


Figura 44. . Curva de calibración para azúcares reductores

11.2 Anexo II curva de calibración para calcular azúcares totales

Los cálculos de concentración de azúcares totales se realizaron conforme a la ecuación de la recta mostrada en la figura 44.

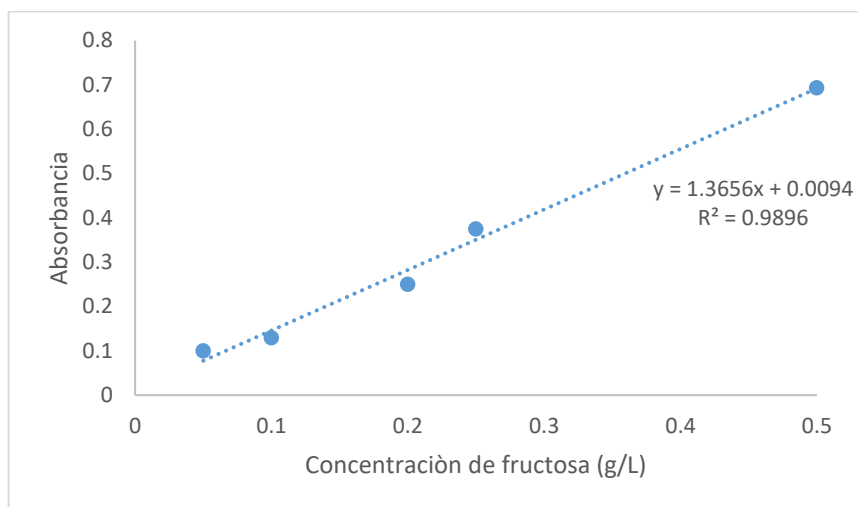


Figura 45. Curva de calibració azucars totals

11.3 Anexo III Curva de calibració para la detección de etanol, y romatograma con estándar interno de butanol

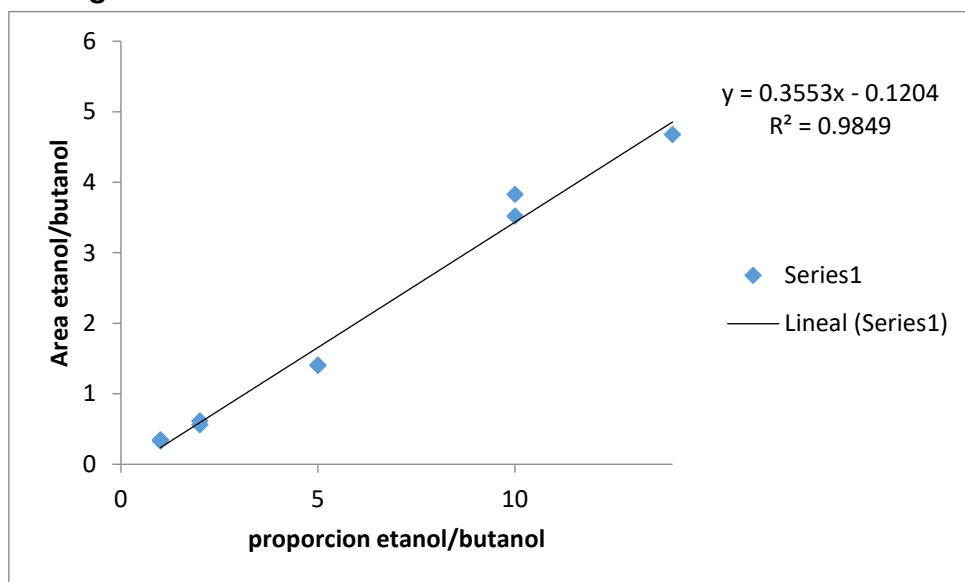


Figura 46. Curva de calibración para azucars totals

A	B	C	D	E	F
[etanol]	área	[butanol]	área	[et]/[but]	área et/ área but
50	3120775	50	8973096	1	0.347792445
50	2975017	50	9054260	1	0.328576493
100	8753877	50	15606826	2	0.560900532
100	1337113	50	2174047	2	0.615034082
250	3250954	50	2316902	5	1.403146961
250	18456729	50	13144669	5	1.404122766
500	10434231	50	2966225	10	3.517680216
500	3842691	50	1003751	10	3.828330931
700	1673203	50	357687	14	4.677841241
700	19607347	50	4993053	14	3.92692547
900	36464298	50	7090150	18	5.14295156
900	52770131	50	10244726	18	5.150955819

Figura 47. Plantilla Excel para determinar ecuación de la recta de concentración de etanol y otros metabolitos. En verde están indicadas las concentraciones de los estándares y en rojo los valores que se utilizan para graficar.

11.4 Anexo IV . Picos de etanol y butanol respectivamente

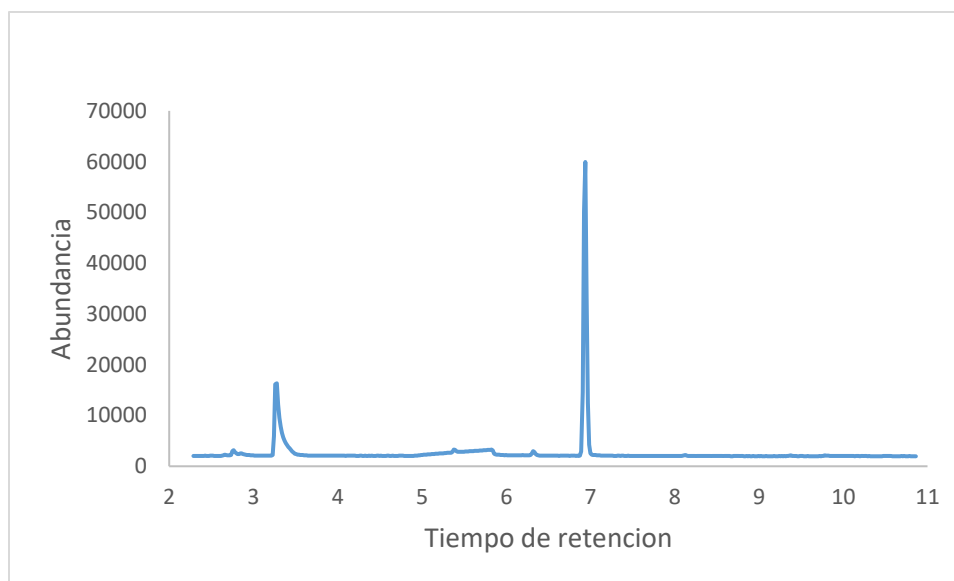


Figura 48. Cromatograma etanol y butanol

11.5 Anexo V Análisis estadístico fase screening

Estructura del ANOVA realizado para evaluar la significancia de la producción de etanol de las seis cepas evaluadas en medio sintético con fructosa como fuente de carbono en la sección de resultado, fase de screening.

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cepas					
pH día 0	6.481	5	1.296	.841	.546
pH día 1	9.414	5	1.883	3.586	.032
pH día 2	6.059	5	1.212	1.969	.156
pH día 3	4.250	5	.850	1.947	.160
pH día 4	8.757	5	1.751	3.482	.036
pH día 5	1.899	5	.380	1.469	.270
pH día 6	2.984	5	.597	4.051	.022
DO día 0	.566	5	.113	1.418	.286
DO día 1	4.877	5	.975	3.462	.036
DO día 2	10.165	5	2.033	4.552	.015
DO día 3	11.341	5	2.268	8.796	.001
DO día 4	9.434	5	1.887	7.233	.002
DO día 5	1.671	5	.334	4.158	.020
DO día 6	3.173	5	.635	1.997	.151
AR día 0	1.346	5	.269	.838	.548
AR día 1	74.159	5	14.832	1.027	.444
AR día 2	51.568	5	10.314	.878	.525
AR día 3	93.987	5	18.797	.487	.780
AR día 4	67.464	5	13.493	.720	.621
AR día 5	125.856	5	25.171	1.620	.228
AR día 6	297.817	5	59.563	6.522	.004

	día 6					
	UFC	9598958.333	5	1919791.667	1.618	.229
	día 0					
	UFC	2665774804687.500	5	533154960937.501	1.585	.238
	día 1					
	UFC	133657708333333.000	5	26731541666666.700	1.672	.216
	día 2					
	UFC	101640273763021.000	5	20328054752604.200	1.465	.272
	día 3					
	UFC	6370407552083.340	5	1274081510416.670	.739	.609
	día 4					
	UFC	4289505208333.340	5	857901041666.667	1.071	.423
	día 5					
	UFC	1117867942708330.000	5	223573588541667.000	.972	.473
	día 6					
	ETOH	2.046	5	.409	2.340	.106
	día 4					
	ETOH	1.117	5	.223	1.277	.335
	día 5					
	ETOH	.985	5	.197	2.206	.121
	día 6					
Agitación	pH	4.183	1	4.183	2.714	.125
	día 0					
	pH	8.354	1	8.354	15.913	.002
	día 1					
	pH	.320	1	.320	.520	.485
	día 2					
	pH	.889	1	.889	2.037	.179
	día 3					
	pH	.825	1	.825	1.640	.224
	día 4					
	pH	.035	1	.035	.136	.718
	día 5					
	pH	.020	1	.020	.135	.720
	día 6					
	DO	.061	1	.061	.758	.401
	día 0					
	DO	.764	1	.764	2.713	.125
	día 1					
	DO	.002	1	.002	.005	.946
	día 2					
	DO	.564	1	.564	2.189	.165
	día 3					
	DO	.008	1	.008	.030	.866
	día 4					
	DO	.043	1	.043	.530	.480
	día 5					
	DO	.098	1	.098	.308	.589
	día 6					
	AR	.075	1	.075	.233	.638
	día 0					
	AR	5.705	1	5.705	.395	.541
	día 1					
	AR	2.460	1	2.460	.209	.655
	día 2					
	AR	.510	1	.510	.013	.910
	día 3					
	AR	11.507	1	11.507	.614	.449
	día 4					
	AR	15.553	1	15.553	1.001	.337
	día 5					

	AR	20.952	1	20.952	2.294	.156
	día 6					
	UFC	93750.000	1	93750.000	.079	.783
	día 0					
	UFC	267600960937.500	1	267600960937.500	.795	.390
	día 1					
	UFC	204166666666.660	1	204166666666.660	.128	.727
	día 2					
	UFC	9848007877604.180	1	9848007877604.180	.710	.416
	día 3					
	UFC	79062760416.667	1	79062760416.667	.046	.834
	día 4					
	UFC	625651041666.666	1	625651041666.666	.781	.394
	día 5					
	UFC	220068984375000.000	1	220068984375000.000	.957	.347
	día 6					
	ETOH	.130	1	.130	.745	.405
	día 4					
	ETOH	.101	1	.101	.578	.462
	día 5					
	ETOH	.050	1	.050	.564	.467
	día 6					
Cepas *	pH	4.940	5	.988	.641	.673
Agitación	día 0					
	pH	2.913	5	.583	1.110	.405
	día 1					
	pH	1.914	5	.383	.622	.686
	día 2					
	pH	.715	5	.143	.328	.887
	día 3					
	pH	4.198	5	.840	1.669	.216
	día 4					
	IV	7.155	5	1.431	5.535	.007
	pH	6.598	5	1.320	8.957	.001
	día 6					
	DO	.076	5	.015	.191	.960
	día 0					
	DO	2.802	5	.560	1.989	.153
	día 1					
	DO	1.019	5	.204	.456	.801
	día 2					
	DO	.508	5	.102	.394	.844
	día 3					
	DO	2.496	5	.499	1.914	.166
	día 4					
	DO	9.241	5	1.848	22.997	.000
	día 5					
	DO	8.578	5	1.716	5.399	.008
	día 6					
	AR	1.316	5	.263	.819	.559
	día 0					
	AR	15.959	5	3.192	.221	.947
	día 1					
	AR	37.512	5	7.502	.638	.675
	día 2					
	AR	43.679	5	8.736	.226	.944
	día 3					
	AR	11.675	5	2.335	.125	.984
	día 4					

AR	56.484	5	11.297	.727	.616
día 5					
AR	21.274	5	4.255	.466	.794
día 6					
UFC	4226562.500	5	845312.500	.713	.626
día 0					
UFC	994584804687.500	5	198916960937.500	.591	.707
día 1					
UFC	11536145833333.300	5	2307229166666.670	.144	.978
día 2					
UFC	37668383138020.800	5	7533676627604.160	.543	.741
día 3					
UFC	1677345052083.330	5	335469010416.667	.195	.959
día 4					
UFC	651380208333.333	5	130276041666.667	.163	.972
día 5					
UFC	1155928359375000.000	5	231185671875000.000	1.005	.455
día 6					
ETOH	.194	5	.039	.222	.946
día 4					
ETOH	.499	5	.100	.570	.722
día 5					
ETOH	.859	5	.172	1.924	.164
día 6					

11.6 Anexo VI Análisis estadístico para cepas de *Kluyveromyces spp.*

Análisis de varianza One way no significativos en la comparación de fermentación entre las dos cepas de *Kluyveromyces spp.*

Tabla 15. ANOVA de pH

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	1.841	0.3069	2.25	0.061
Error	35	4.780	0.1366		
Total	41	6.621			

Tabla 16. Prueba de Tukey para pH

Factor	N	Media	Agrupación
pH0	6	4.0500	A
pH1	6	3.942	A
pH5	6	3.858	A
pH6	6	3.812	A

pH4	6	3.587	A
pH2	6	3.5117	A
pH3	6	3.4650	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 17. ANOVA de sólidos disueltos expresados en °Brix

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	47.93	7.9883	8.43	0.000
Error	35	33.15	0.9470		
Total	41	81.08			

Tabla 18. Prueba de Tukey para medias de sólidos disueltos

Factor	N	Media	Agrupación
B0	6	7.9833	A
B1	6	6.467	A B
B2	6	5.483	B
B3	6	5.083	B
B5	6	5.000	B
B4	6	5.000	B
B6	6	4.817	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

11.7 Anexo VII Catabolismo de compuestos aromáticos en condiciones anoxigenicas.

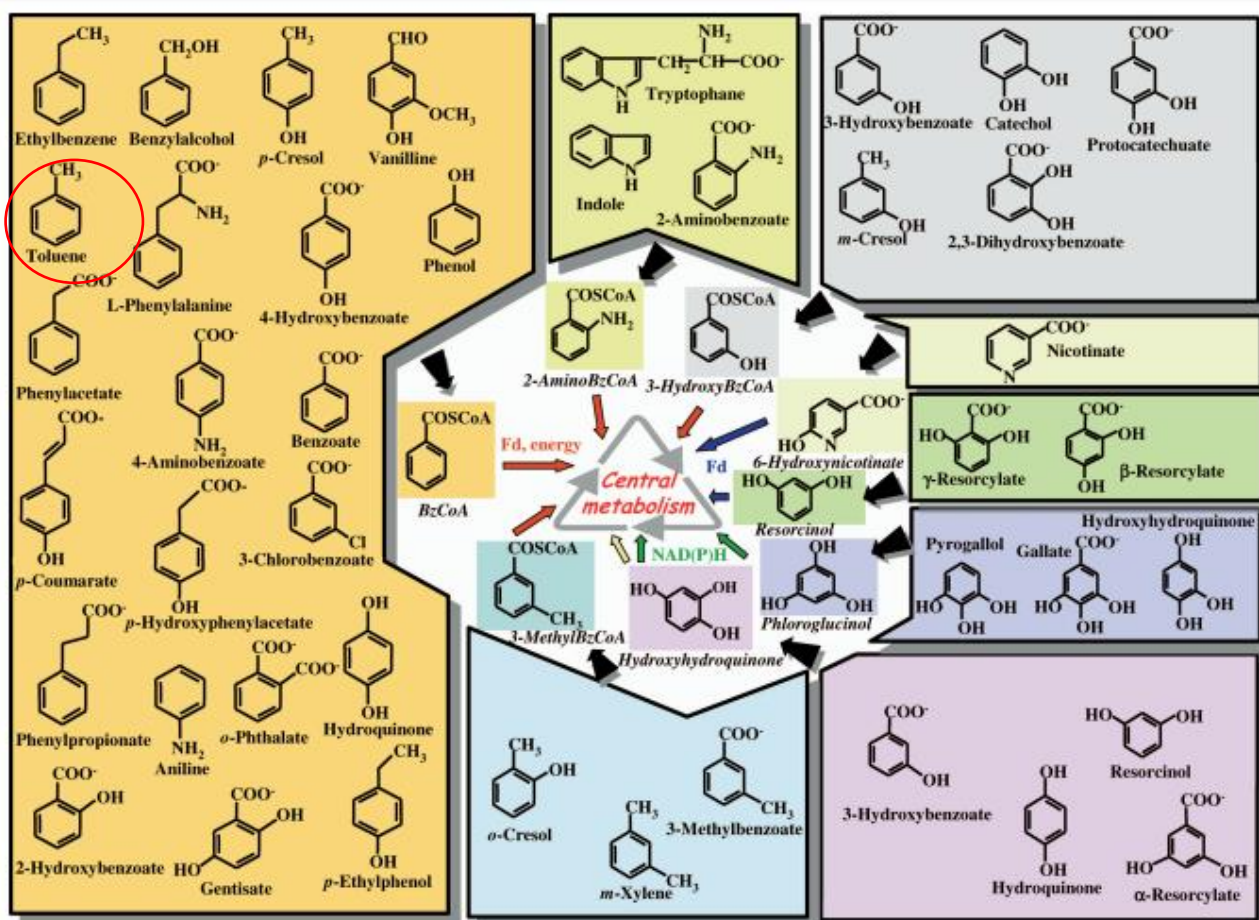


Figura 49. Tolueno en círculo rojo. Tomado de Carmona, M., Zamarro, MT, Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, JF, Valderrama, JA, ... y Díaz, E. (2009). Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos: una visión genética y genómica. Microbiol. Mol. Biol.

11.8 Anexo VIII Proyecto de estancia internacional, colaboración con UCL (Londres).

Éste es un reporte del trabajo realizado en una estancia en Londres llevada a cabo de septiembre a Diciembre del 2018, la institución en donde se realizó dicha estancia es UCL (University College of London), con el apoyo directo del PhD. Michael Sulu, en la cual se realizaron fermentaciones para obtención de etanol a partir de residuos de café molido post uso, con el método de sacarificación-fermentación, la sacarificación se realizó con enzimas, y la fermentación fue a

pequeña escala en biorreactores de 500 ml. La importancia de ésta estancia radica en el reforzamiento de colaboración con otras instituciones que permita el crecimiento de redes profesionales y la mejora del flujo de información, así como el enriquecimiento en técnicas y procesos, en este proyecto aporta una ampliación en el campo de acción, dado que se trabajó con material hemicelulósico, el cual en el caso de la producción del sotol es una problemática en la cual se está trabajando a la par.

Evaluation of pretreatment and *S. cerevisiae* and *P. stipitis* production of ethanol from spend ground coffee.

Stay project



University College of London

Salma Sarahí Ávila Hernández

Universidad Autónoma de Chihuahua, México

December, 2018

Coffee is one of the most consumed in the world, according to Quintero in 2014, in the year 2010 there were nearly 6000000 tons of coffee, so the waste of ground coffee after processing is a significant amount of lignin cellulosic material waste that has a high potential for use for industries such as biofuels , however it is necessary to know in detail the ways to turn this waste into a raw material to obtain, in this case bioethanol . The SCG and CS they are attracting attention because of the waste generated catidad which becomes a potential problem of pollution , for which alternatives have been proposed for its use and exploitation, one of the proposed uses of the SCG it's like fuel for boilers industrial since they have a high calorific

power (5,000 kcal / kg approx.) (Silva et al., 1998), it has proven to be an excellent substratum for Culture of microorganisms (Machado et al., 2012) .

To design an efficient process for obtaining ethanol from ground coffee beans, it is necessary to know the chemical composition as well as the process by which it is subjected to its production.

The coffee has an approximate humidity of 6%, contains 4.34% of ashes in which the minerals are included , 10% of fats, and 14.55% of protein, for which approximately the remaining 65% corresponds to the sugars (Calero, 2017) . the SCG is compound of 37.03% of mannose , 31.90% of galactose , 24.08% of glucose and 6.99% of arabinose (Sluiter et al., 2010) .

The benefit of the fruit can be done in d os ways, the wet process, which involves pulping, and desmucilagínación using water, dried fruit and elimination of internal wrappings (parchment and film) by means of hackneyed which is utilizado for coffee washed or soft, the other process involves the fermentation of the fruit with all its rinds, the drying of the fruit and the elimination of the wrappings in a single mechanical operation such as threshing (Noriega Salazar et al., 2009). In raw figures from 1 kg of coffee, 385 g of waste are obtained at the end of its processing. There is a significant amount of fermentable sugars in the ground coffee residues which are polomerizados in dorma of cellulose and hemicellulose , speaking in percentage corresponds to 51.5 and 40.45% w / w respectively (Ballesteros, 2014), The presence of lignin in plants aims to provide support, impermeability and resistance to chemical and microbial attack. These properties vary with the type of lignin precursors (alcohol p coumaril , coniferil -alcohol or sinapil ,That alcohol, once its, interfere in its solubility in neutral, acidic or alkaline medium (J. Leif , 2016). Lignocelluloses represent the most abundant and lowest-cost biomass in the world ; their useallows either the production of a valuable biofuel and the utilization of a wide range of residues of domestic , agricultural , or industrial activities (Rodrig ues et al, 2001) , for which it is important to consider pretreatment as one

of the fundamental steps for the use of the fermentable zucars contained in the aforementioned polysaccharides.

The coffee is treated according to the intended use , for example for the production of biodiesel a transesterification is carried out , however it is not recommended to carry out a direct transesterification since its high contents of free fatty acids does not allow a good conversion, for what is opted for a previous fat extraction (Burton et al, 2010).

Lignin provides support, impermeability and resistance to chemical and microbial attack. These properties vary with the type of lignin precursors (p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol -alcohol or sinapil, thereof conferring its degree of solubility in neutral, acid or alkaline medium. Lignocellulose it is a cheaper raw material than conventional raw materials of agricultural type . For the release of fermentable sugars and convertible into ethanol acid and basicpretreatments are used mainly, individually or in combination, the most used are acid hydrolysis with sulfuric acid at low concentrations (between 1-10%) and high temperatures (121-125 ° C), since this has shown that using high concentrations and low temperatures imply higher cost in the process, as well as a low recovery of sugars (Burton et al., 2010). The acid pretreatment generally is more selective for removing lignin hemicellulose, however alkali treatment or combined are significantly higher in removal. (Sluiter et al., 2010) . It is known that the highest hemicellulose removal is obtained with acid concentrations between 0.1 and 1% and high temperatures, (J Leif , 2016). Pretreatments with KOH at 60 ° C on corn wastes, conversion of crystalline cellulose into amorphous and degradation of lignin, resulting in high anaerobic digestibility of these residues (S. Muhammad et al., 2016).

In cellulosic ethanol processes , pretreatment of lignocelluloses to disrupt their recalcitrant structures is needed in order to increase the digestibility of materials . Among many pretreatment methods (uncatalyzed steam explosion , liquid hot water , diluted acid , and ammonium fiber / freeze explosion - AFEX), which are usually achieved through a convection or conduction based he

ating . Other authors mention that at low temperatures they are adequate since this way the production of fermentation inhibiting substances is limited, especially with the alkaline treatment , they remove the lignin and reduce the crystallinity of the material, improving its digestibility. Treatments with hydrogen peroxide and acetic acid at 80 ° C have been reported on pine wood, which have shown a high lignin removal reaching yields in alcoholic fermentation of 84 % (W. Seung et.al. , 2015). The diluted acid generates a poor removal of lignin and hemicellulose in all materials, although it is selective towards hemicellulose . A combined treatment, diluted acid followed by alkali, is an alternative but more aggressive, presents good removal of lignin and hemicellulose , however it generates significant loss of cellulose in bagasse and husk (Torres Jaramillo et al., 2017).

The combination with alkali pretreatment can accelerate the chemical reaction rate by lignin removal and partial hemicellulose degradation ., nowadays microwave is combined with alkali pretreatment because it can accelerate the chemical reaction rate by lignin removal and partial hemicellulose degradation (Ballesteros, 2014).

Cellulose is resistant to attack with diluted acid, so an eco-friendly alternative to degrade it is to use biological agents such as fungi of white rot of the wood, due to its high selectivity towards the removal of lignin, facilitating acid treatment to eliminate hemicellulose , leaving cellulose intact.

The sodium hydroxide is adsorbed on the cellulose and generates a swelling generating alkali-cellulose complexes ($C_6H_{10}O_5 - NaOH - 3H_2O$), removing substantial amounts of cellulose plus hemicellulose and lignin and may increase or decrease the crystallinity of cellulose after pretreatment, this effect varies with different lignocellulosic plant components. When the cellulose is washed with water, it recrystallizes in an antiparallel form to form cellulose type II. (J Leif , 2016). In the same way, pretreatments with KOH at 60 ° C on corn residues, they generated crystalline cellulose conversion in lignin degradation, producing a high anaerobic digestibility of the waste pretreated (S. Muhammad et al., 2016). Treatments with hydrogen peroxide and acetic acid at 80 ° C on pine

wood, have been a high removal of lignin reaching yields in alcoholic fermentation of 84% (W. Seung et al., 2015).

Microwave irradiation appears as an alternative method. microwave-assisted pretreatment have been studied because of its high heating efficiency to disrupt the ultrastructure of cellulose. microwave irradiation induces an interaction between a heated object and an applied electromagnetic field that gets more polar to lignocellulosic material and produces a species of specific explosion that broke the molecule. (Ma H et al., 2009).

The degradation of lignin-phosphate material requires can also be performed using enzymatic processes, degradation of cellulose requires cellobiohydrolases, glucosidases and endoglucanases, it is also an important part of the step the saccharification, the most popular are Viscozyme and Novozyme, however the negative influence on solid percentage over the conversion to glucose was attributed to enzymatic inhibition caused by the increase in glucose concentration. In spite of the low reducing sugar yields obtained when high substrate concentration is used, from the point of view of the process (fermentation), a high reducing sugar concentration is needed for ethanol production, which is only achieved when using high solid content. (Vásquez et al. 2007). The fermenting microorganism plays a crucial role in this process, as previously mentioned *Saccharomyces cerevisiae* is the most used yeast for ethanol production since it has the capacity to grow in media with a high content of sugars concentration and its high performance of ethanol production, its limitation lies in its low or zero capacity to ferment pentose such as xylose which is one of the products during the hydrolysis of the hemicellulose, other genera like *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* and *Pachysolen*, filamentous fungi like *Paecilomyces*, *Mucor*, *Monilia* and *Fusarium*, and bacteria *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Thermoanaerobacter* they have this ability, however *Pichia stipitis* is generally the choice to ferment

pentoses from hemicellulose . (Mussato et al., 2012). In this work they will be used *S. cerevisiae* and *P.stipitis* .

Method.

To carry out the experiments we used the ground coffee beans waste from the cafeteria print room , were taken at 10 o'clock in the morning, whereby they are fresh waste, with the help of gloves and stored in a ziploc bag , the humidity percentage of the sample was determined by previously placing 50 mlfalcon tubes at a constant weight. which were weighed empty and 2 to 3 grams of coffee were added, the weight of the falcon plus the sample was recorded and placed in an oven at 100 ° C in an oven for 24 hours, then the tubes were weighed again and the calculation of humidity. It is worth mentioning that the raw material was not dried for experimentation. In this case the extraction of fat is not performed, however two pre-treatments , acid and alkaline, are carried out; utilizó sulfuric acid and sodium hydroxide, both at 2% concentration to achieve hydrolysis of lignucelulósico material, to which 11.7 ml of each of the solutions prepared was added 5.5g of coffee, a blank sample which contained added only water and coffee, the samples were autoclaved for a period of one hour at 121 ° C to 15 lb. of pressure , the pH is adjusted to 5, the samples are centrifuged, the supernatant is discarded and the pellet is resuspended in 1 ml of tris chlorine buffer, to which 50 µl of viscozyme is added and incubated in a thermixer for 24 hours at 150 5pm and 50 ° C. The samples will be analyzed by means of HPLC / ICS for determination of zucares and choose the Qua r pretreatment. After the choice of pretreatment , the pretreatedsamples are submitted to a shaker in an erlen flask meyer 250 ml at 50 ° C and sample is taken first every 30, then every 60 and then every 90 minutes, this process lasts 48 hours.

For fermetnación flask two pre - inoculums *S. cerevisiae* 50 ml Erlen flask is prepared Meyer 250 ml, which are incubated at 30 ° C at 120 rpm for 24 hours, choose the flask with higher optical density (600 nm). S and prepare six flasks as follows: 3 flasks contain 50 ml of pretreated and vizcozima coffee (in the same

proportion as mentioned in the previous section), 2 flasks with 50 ml of pretreated coffee without enzyme, a flask with 50 ml of 20g / L of glucose, and a white flask containing 50 ml of pretratedp coffee and the enzyme, 5 ml of the pre-inoculum is added to each flask, except the blank, and they are taken to the shaker at 30 ° C at 100rpm for 48 hours. hours, samples are taken every 3 hours, the samples will be analyzed by ICS / HPLC, for which the samples were prepared in the following way, the samples are centrifuged at 13,200 rpm for 20 minutes at 4 ° C, 100 µl of supernatant and are diluted to 1 ml with MiliQ water depositando the solution in an HPLC vial, this is a 1/10 dilution for reading ethanol, this sample was taken and 100 µl aforan to 1 ml and placed in an HPLC vial, this sample corresponds to a 1 / 1000 for the determination of carbohydrates in HPLC, which are arabinose, glucos , and galactose to be determined. For the calibration curves in the case of sugars, standards of 0.02 , 0.01 , 0.005, 0.002 and 0.001 g / L of each monosaccharide were prepared, for which 10g / L of each of the sugars was prepared and 10 µl was taken each and were aforaron 1 ml, corresponding to 0.1 g / L, starting from this primary standard the above standards were prepared and the calibration curve was made. For the ethanol calibration curve, 20 g / L of absolute ethanol was prepared, from which the standards of 10, 5, 2.5 , 1 , and 0.5 g / L are prepared . After this process, Dasbox will be climbed with the optimal conditions of fermentation, the preparation of the media is equal to the perparation of means for fermentation in flask, but adjusting it to the proportion of 120 and 250 ml, for which a sample was prepared with each yeast and glucose, another with yeast and saccharified coffee, as well as a white, and the conentration of sugars and ethanol will be determined, in the same way previously described. fermentation will take cab to 30 ° C, 400 rpm and pH 5.0

The above process will be repeated for a *Pichia* strain *sptipitis* , a comparison will be made between the products of the strains.

Results

The humidity of the samples was calculated by the netx way:

$$\% \text{humidity} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} * 100$$

W1= weight of the falcon

W2= wight with wet sample

W3=weight of dry sample plus falcon



Fig 1. Spend coffe ground.

The results are :

sample	W1	W2	W3	% Humidity
1	13.28	15.44	14.01	65.0
2	13.15	15.72	13.98	65.6
3	13.25	15.67	14.07	64.0
				64.83

The middle of SCG hummidity is 64.83%.

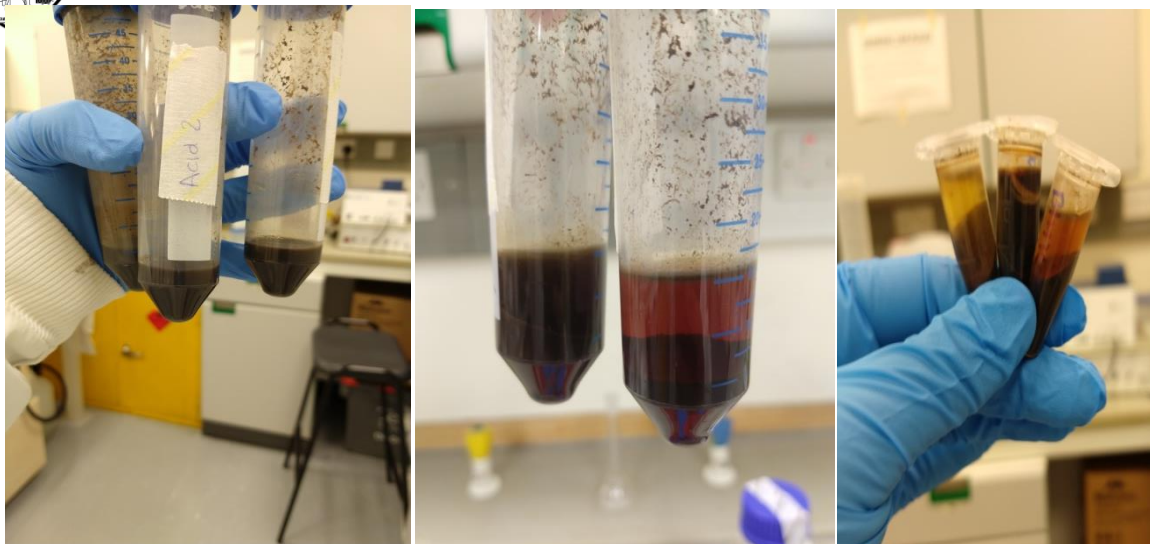


Fig 2. Aspect of the samples after acid/alkali pretreatment, the first shows the blank, the acid and the alkali, the second image shows in the left alkali pretreatment and acid pretreatment before the saccharification process; the third shows the acid, alkali and the blank post enzymatic and centrifugation process.

As it can be observed the aspect of the samples after the acid and alkali pretreatment combined by heat are so different, it is more evident when the samples are centrifugated, it shows that apparently the sulfuric acid is more effective to hydrolyze the hemicellulose than sodium Hydroxide, because there is a major clarification of the media, when the samples are tried with viscozyme these differences are more clear, the sample treated with acid is most clarified than the sodium hydroxide even than the blank (third eppendorf), for this reason we can suggest that the acid-enzyme pretreatment broke the hemicellulose more effectively.



Fig 3. from left to right; Supernatant of the acid pretreatment (3), the blank, and the alkali pretreatment.

It observed that the acid pretreatment was mor efficient to hidrolyze the SCG, those samples shows a clarification of the media, if it is compared with the blank which was less clarify tan acid, it can suggest that the acid could break more molecules of lignocellulosic material, the alkali pretreatment showed more qantitie of solid residues in the supernatant even after the centrifugation process.

Acid and alkali pretreatment

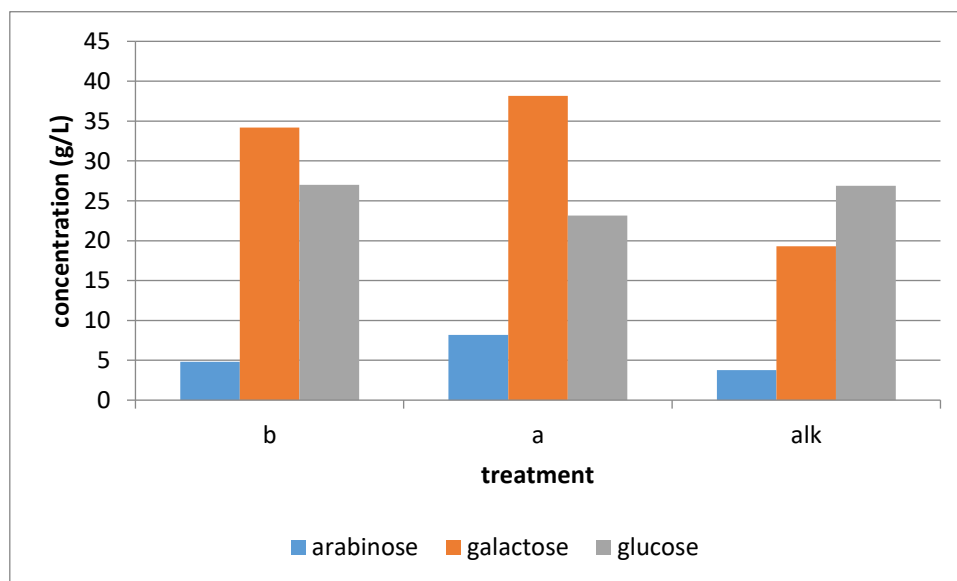


Fig 4. Release of sugars by acid and alkali pretreatment.

The blank contains 4.8074 g/L of arabinose, 34.1787 g/L of galactose and 27.0187 of glucose. It can observed that the acid sulfuric pretreatment is better tan sodium hydroxyde, acid pretreatment released concentration of arabinose , galactose and glucose about 8.1619, 38.1734 and 23.1359 g/L, and 3.7611, 19.2844, and 26.3885 g/L respectively for sodium hidroxyde, however the concentration is higher in the blank tan in the two pretreatments.

Time of pretreatment

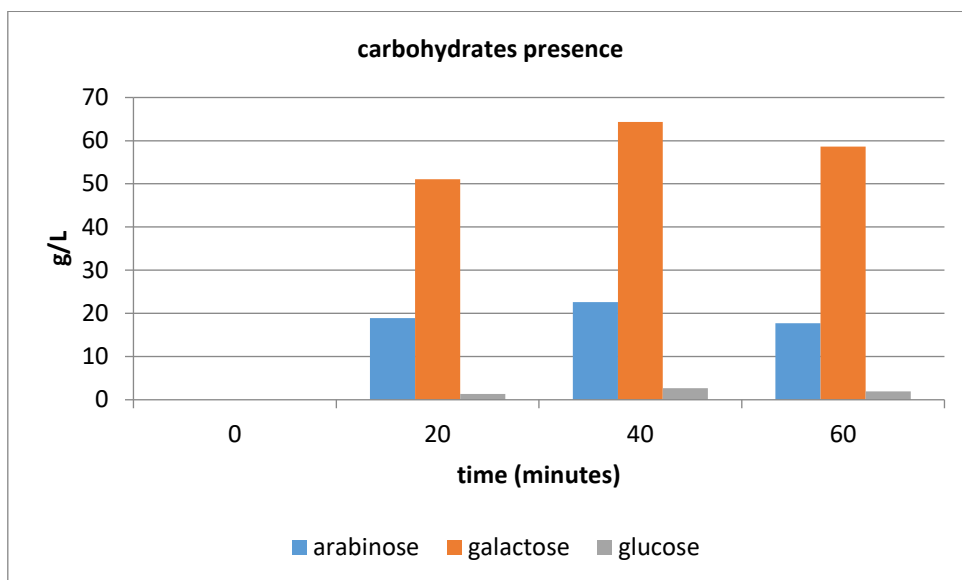


Fig 5. Monosacharides concentration by time of pretreatment presence.

So many authors like Sluiter in 2010 suggest high temperature and long times (one hour about) like the best pretreatment to hidroyze lignocellulocic material, however in this case the best time of preratment was at 40 minutes at 121°C and 15 lbs psi, it can be observed in the fig 5, that the concentration of the sugars analyzed are in most quantity at that time , and them descreased until 60 minutes, the most abundant sugar was galactose with 64 g/L , then arabinose with 22 g/L and finally glucose with 2.71 g/L, this results can be different with another authors because there´s some aspects different between experiments like the specie of coffe, concentration of the solvent, and solvents used.

Saccharomyces cereviviae flask fermentation

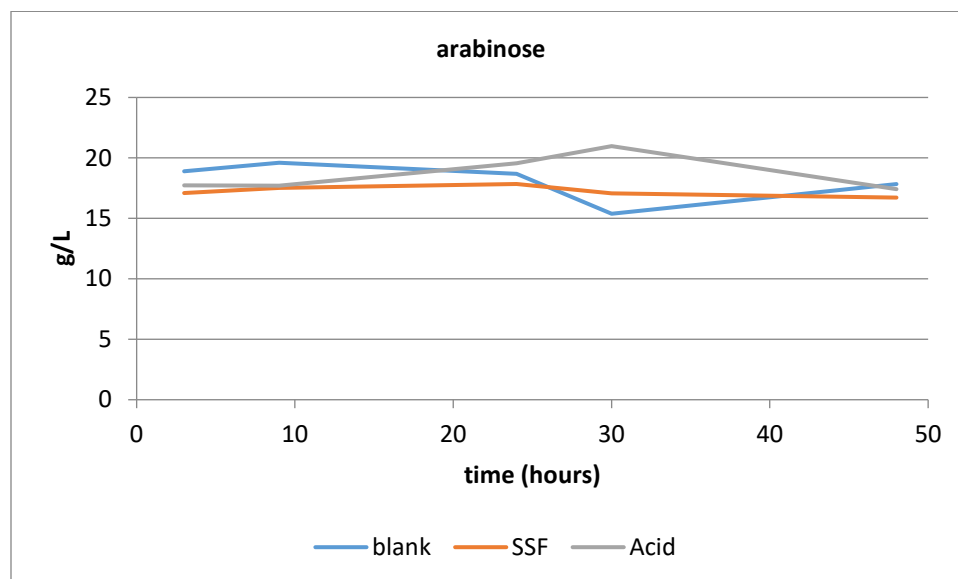


Fig 6. Concentration kinetic of arabinose.

It can be observed that the blank had an atypical behaviour because between the time 20 and 30 there is a decrease of arabinose of 5 g/L approximately, it could be a contamination of the media, or an error at the moment to analyze the sample, because after that at the end of the fermentation it increased again, in the case of the SSF and acid pretreatment shows the incapacity to consume this sugar, there is a little increase of arabinose in acid pretreatment near by the time 30 it may be a detection of another compound that was detected by the analysis. In general *Scerevisiae* couldn't consume arabinose.

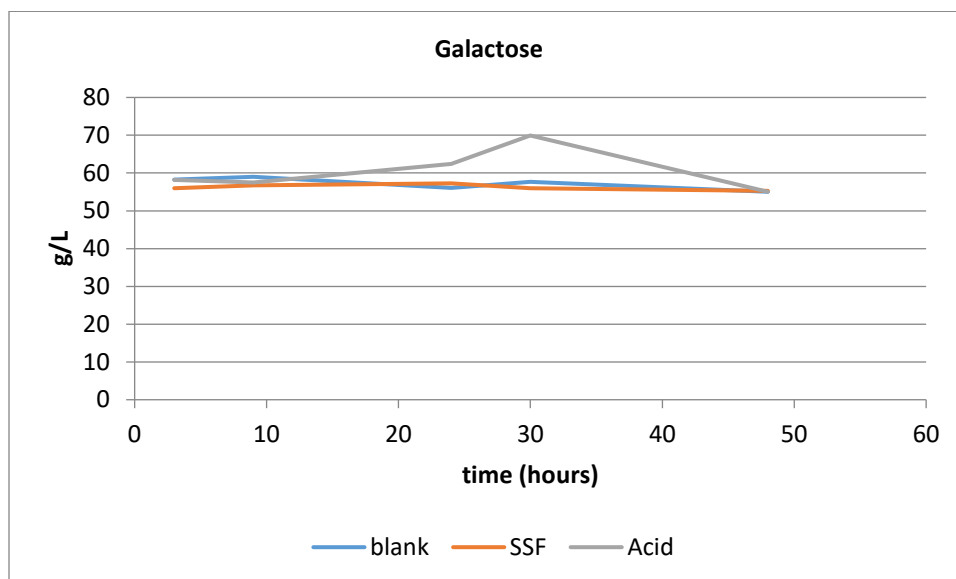


Fig 7. Concentration kinetic of galactose.

Again the fermentation with only acid pretreatment had an atypical behaviour, it can be caused for the detection of another compounds that are being grouped for the equipment, because in the case of the blank an SSF could not be consumed, *S. Cerevisiae* doesn't have this capacity.

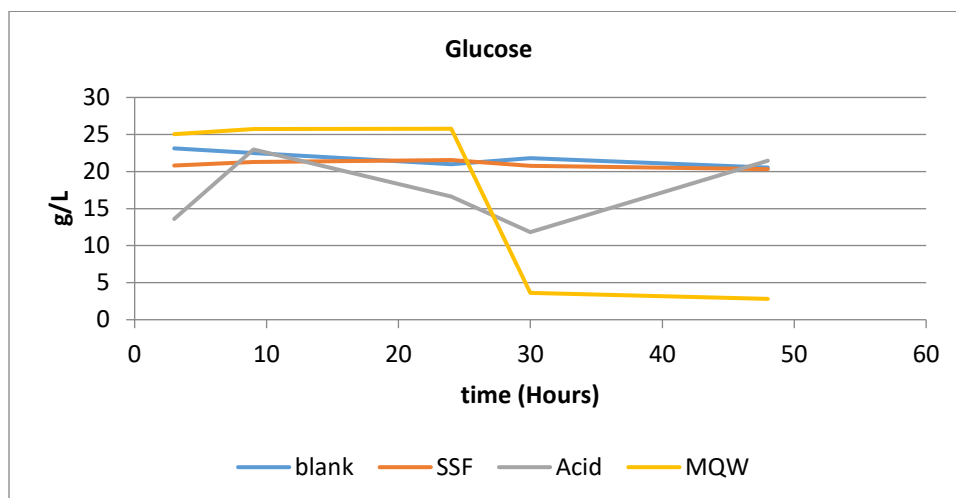


Fig 8. Concentration kinetic of glucose.

The consume of glucose was successfully only in the case of the sample with miliQ water, but it began at time 24, perhaps a problem of adaptation of the media, it was consumed totally at the end of the fermentation, in the other cases the glucose wasn't consumed with exception of the sample without enzyme that could consumed 10 g/L.

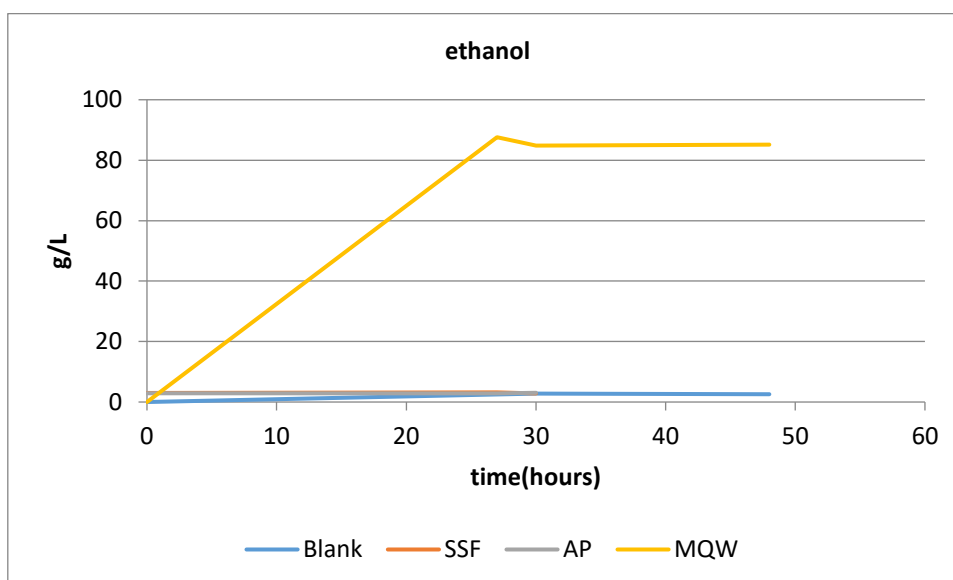


Fig 9. Production of ethanol in different conditions.

The production of ethanol was poor in the enzymatic-acid and acid pretreatment, the highest concentration in those case was 3.4 g/L for enzymatic-acid pretreatment replica number 2, apparently there's no a significative difference between the pretreatments, the yeast could be died for the ethanol concentration increase, pH changes or the recalcitrant compounds presence in the coffee produced for the previous acid heat pretreatment, however, the experiment with miliQ water and glucose showed the production of 87.6 g/L at time 27 and it coincide with the consume of glucose at that time.

In general *S. cerevisiae* didn't show good behaviour of consume of galactose and arabinose and ethanol production.

***Pichia stipitis* fermentation**

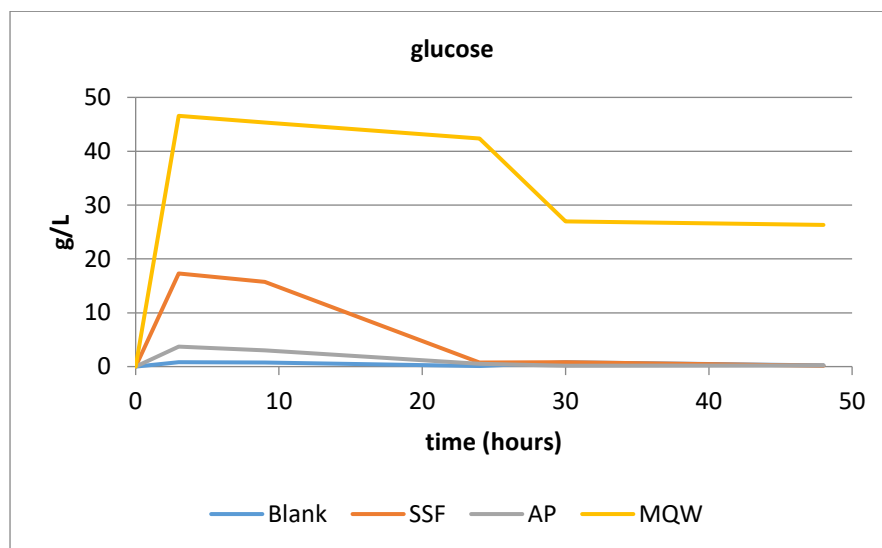


Fig 10. Kinetick of glucose consume

In both fermentation the glucose could be released and consumed, but in the case of SSF the releasing of glucose was major, 17 g/L and 3 g/L for acid pretreated

sample, SSF was faster to release but acid was faster to consume it, the yeast consumed all of the glucose in at 24 hours, in media with glucose didn't consumed all the glucose.

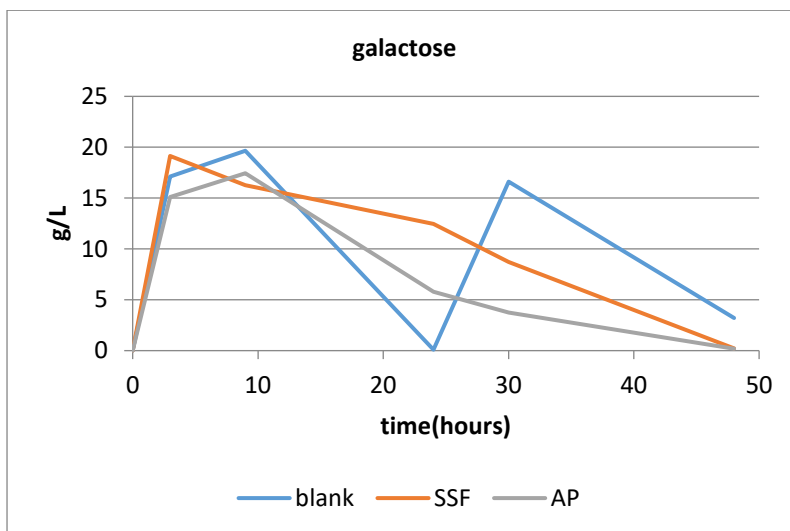


Fig 11. Kinetic of galactose consume.

The blank had an atypical behaviour, it could be a contamination problem, in the case of SSF an acid pretreated samples have practically the same capacity of release and consume galactose, but without enzyme the consume is faster, the concentration initial of galactose was 19 g/L and 15 g/L for SSF and acid pretreatment respectively, and consumed the totality at time 48.

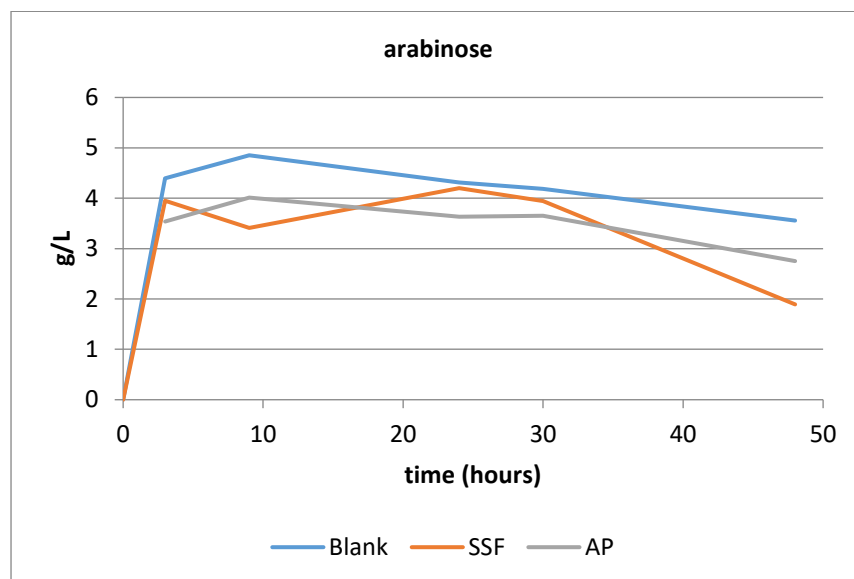


Fig. 12 kinetick of arabinose consume.

It can observed that in both cases *Pichia* had difficulties to consume arabinosa, regret of release 4.2 g/L and 4 g/L respectively of the monosaccharide, it only consumed a media of 1.5 g/L of arabinose.

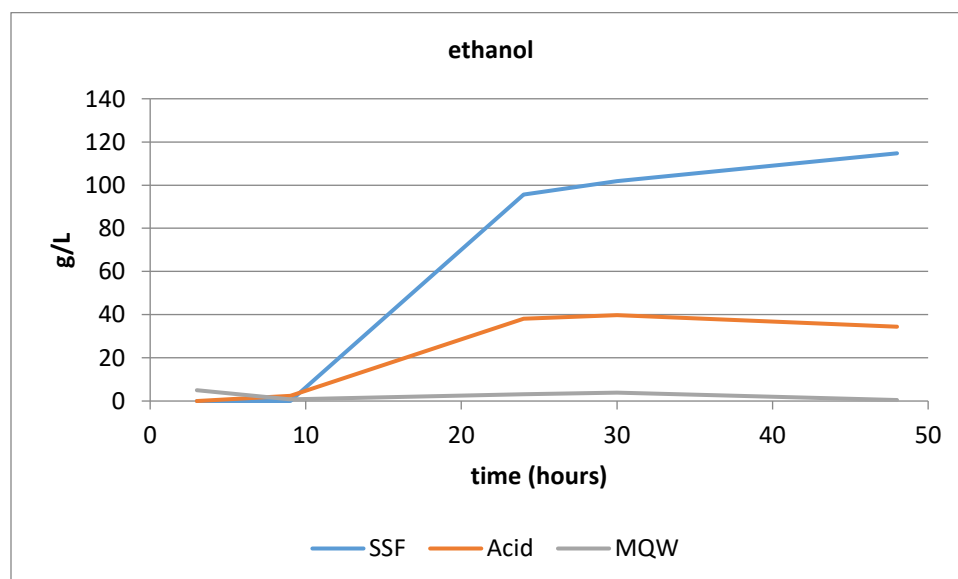


Fig 13. Production of ethanol

The SSF produced more concentration of ethanol than the acid and miliQ water the the acid process produced the major concentration of ethanol at time 30 (40 g/L) and SSF produced at the end of the fermentation 118 g/L of ethanol.

It howed the high capacity of *Pichia* to produce ethanol.

Dasbox fermentation

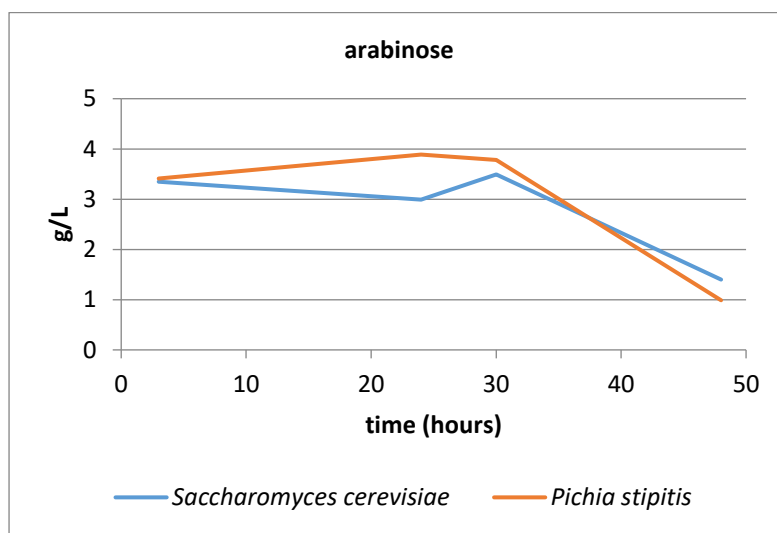


Fig 14. Behaviour of arabinose consume in Dasbox

S. cerevisiae had less capacity of consume arabinose than *Pichia*, However, both yeast used it after the 30 hours of the fermentation, it means that arabinose is not the first option to consume, the final concentration was of 1g/L fpr *Pichia* and 1.5 g/L for *S.cerevisiae*.the initial concentration was 3.2g/L.

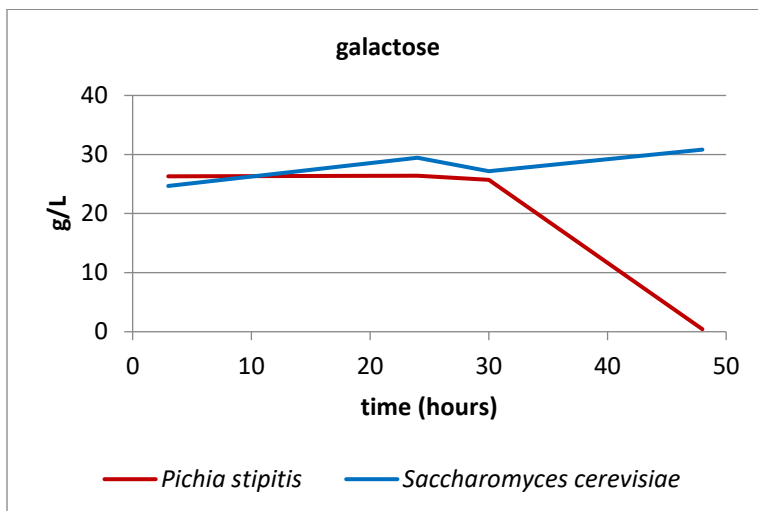


Fig 15. Behaviour of consume of galactose in Dasbox

In flask fermentation was observe that *S.cerevisiae* was not a goo consumer of galactose, and the figure 15 confirm it, practically the concentration of galactose at the end of the process is the same (25 g/L). In the case of *Pichia* began to consume after the time 30 but it was consumed in totality, it means that it consumed another monosaccharides first.

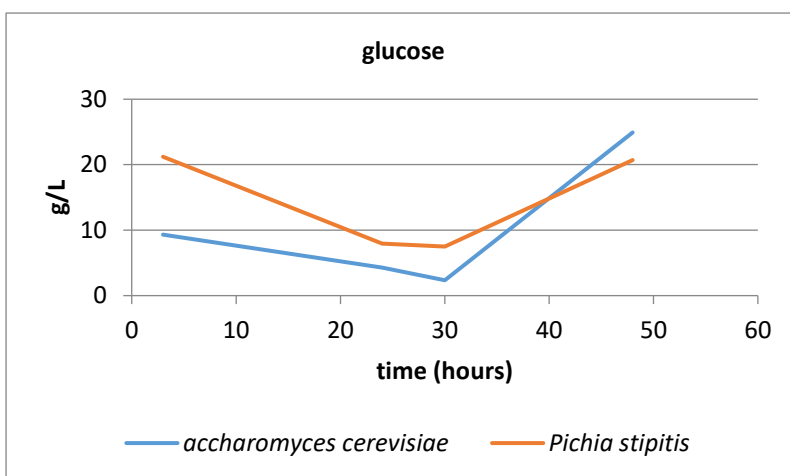


Fig 16. Behaviour of consume of glucose in Dasbox

Both yeasts have the capacity to consume glucose, but *S. cerevisiae* was faster, it for its incapacity to metabolize galactose and arabinose, but it can be observed that there was an increase of the glucose in the time 30 for both yeasts, it is possible that the conditions in the media provide the degradation of fractions of cellulose and cause this increase or the equipment had detected another compounds similar in retention time and added at the glucose quantification, the initial concentration was 20 g/L and at time 30 was of 7 g/L approximately and at the end of the fermentation increase to 20 g/L again. despite the sugars were consumed, the yeast didn't produce ethanol.

In conclusion the best yeast to try SCG was *Pichia stipitis*, it had a good capacity to consume arabinose, galactose and glucose, but it had minor preference for arabinose, and high preference for galactose until finish to consume glucose, the enzyme didn't release high quantities of sugars, the best time to treat the CG was 40 minutes and the best pretreatment was with sulphuric acid, it is necessary to proof another conditions that improve the action or evaluate the possibility of change the enzyme, it is necessary to add an internal standard to check if the results of the HPLC are in the correct range, it can reduce interference between the lectures and corrects the deviation, the calibration of the Dasbox use is essential for the correct use and reliable results.

SCG has a high potential to exploit, it is possible to use it to produce biodiesel, it has near by 10% of oil, and bioethanol at the same time, and with the bagasse of it produce raw material like fertilizer or pellet for heating houses, because it has a 20% heat capacity more than wood.

Bibliography

- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Calero, Samantha Miranda, et al. "Análisis proximal de granos de arroz, frijol, maíz y café comercializados en el mercado Roberto Huembes de Managua." *Universidad y Ciencia* 9.14 (2017): 45-51.
- Noriega Salazar, Adrianela, Ramón Silva Acuña, and Moraima García de Salcedo. "Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal." *Zootecnia Tropical* 27.2 (2009): 135-141.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. Food Bioprocess Technol (2014) 7: 3493. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., de Macedo, G. R., & Gonçalves, L. R. B. (2011). Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6), 929–943. doi:10.1007/s12010-011-9185-3
- Vásquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza, M. B., Jr., & Pereira, N., Jr. (2007). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136–140, 141–154
- Ma, H., Liu, W. W., Xing, C., Wua, Y. J., & Yu, Z. L. (2009). *Bioresource Technology*, 100, 1279–1274
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Calero, Samantha Miranda, et al. "Análisis proximal de granos de arroz, frijol, maíz y café comercializados en el mercado Roberto Huembes de Managua." *Universidad y Ciencia* 9.14 (2017): 45-51.
- Noriega Salazar, Adrianela, Ramón Silva Acuña, and Moraima García de Salcedo. "Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal." *Zootecnia Tropical* 27.2 (2009): 135-141.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. Food Bioprocess Technol (2014) 7: 3493. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., de Macedo, G. R., & Gonçalves, L. R. B. (2011). Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. *Applied*

Biochemistry and Biotechnology, 164(6), 929–943. doi:10.1007/s12010-011-9185-3

- Vásquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza, M. B., Jr., & Pereira, N., Jr. (2007). Applied Biochemistry and Biotechnology, 136–140, 141–154
- Ma, H., Liu, W. W., Xing, C., Wua, Y. J., & Yu, Z. L. (2009). Bioresource Technology, 100, 1279–1274
- J. Leif y M.Carlos. " Pretratamiento de lignocelulosa : formación de inhibidores por productos y estrategias para minimizando su efectos ". BioresourceTecnología. Vol. 199, pp. 103-112. 2016.
- Burton, Rachel, Xiaohu Fan y Greg Austic . " Evaluación de dos pasos reacción y enzima catálisis enfoques para la producción de biodiesel desde gastadocafé motivos ". *Revista Internacional de Energía a Verde* 7.5 (2010): 530-536.
- 28 □ W. Seung, C. Eun, L. Dae-Seok, L. Soo, L. Young and B. Hyeun. "Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials". Biotechnol. Biofuels. Vol. 8 N° 228, pp. 3-11. 2015.
- 30 □ S. Muhammad, L. Jianghao, Z. Jiafu, H. Yan, W. Wen, C. Chang and L. Guangqing. "Improve the Anaerobic Biodegradability by Copretreatment of Thermal Alkali and Steam Explosion of Lignocellulosic Waste". BioMed Research International. Vol. 2016. Article ID 2786598. 10 pages. 2016. DOI: 10.1155/2016/2786598.
- Mussatto , Solange I., et al. " Azúcares metabolismo y etanol producción por diferente levadura son desde café industria desechos hidrolizados ". *Aplicado Energía* 92 (2012): 763-768.
- Rizzuto, María Liliana Quintero, and Maritza Rosales. "El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad." *Visión Gerencial* 2 (2014): 291-307.

$$\% \text{humidity} = \frac{W2 - W3}{W2 - W1} * 100$$

W1= weight of the falcon

W2= wight with wet sample



W3=weight of dry sample plus falcon

Fig 1. Spend coffe ground.

The results are :

sample	W1	W2	W3	% Humidity
1	13.28	15.44	14.01	65.0
2	13.15	15.72	13.98	65.6
3	13.25	15.67	14.07	64.0
				64.83

The middle of SCG humidity is 64.83%.

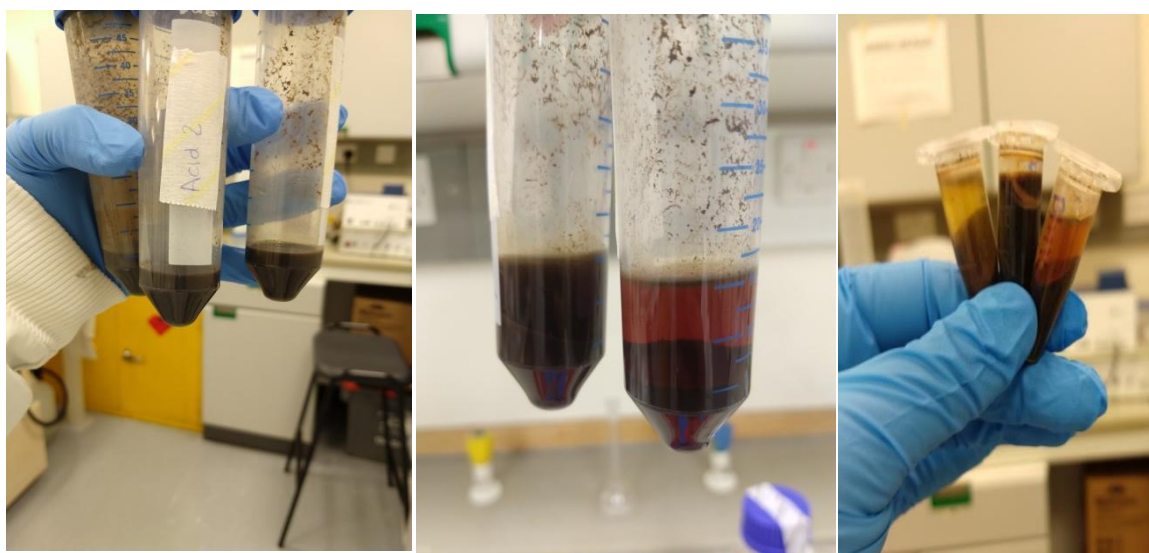


Fig 2. Aspect of the samples after acid/alkali

pretreatment, the first shows the blank, the acid and the alkali, the second image shows in the left alkali pretreatment and acid pretreatment before the saccharification process; the third shows the acid, alkali and the blank post enzymatic and centrifugation process.

As it can be observed the aspect of the samples after the acid and alkali pretreatment combined by heat are so different, it is more evident when the samples are centrifugated, it shows that apparently the sulfuric acid is more effective to hydrolyze the hemicellulose than sodium Hydroxide, because there is a major clarification of the media, when the samples are tried with viscozyme these differences are more clear, the sample treated with acid is most clarified than the sodium hydroxide even than the blank (third eppendorf), for this reason we can suggest that the acid-enzyme pretreatment broke the hemicellulose more effectively.



Fig 3. from left to right; Supernatant of the acid pretreatment (3), the blank, and the alkali pretreatment.

It was observed that the acid pretreatment was more efficient to hydrolyze the SCG, those samples show a clarification of the media, if it is compared with the blank which was less clarified than acid, it can suggest that the acid could break more molecules of lignocellulosic material, the alkali pretreatment showed more quantity of solid residues in the supernatant even after the centrifugation process.

Acid and alkali pretreatment

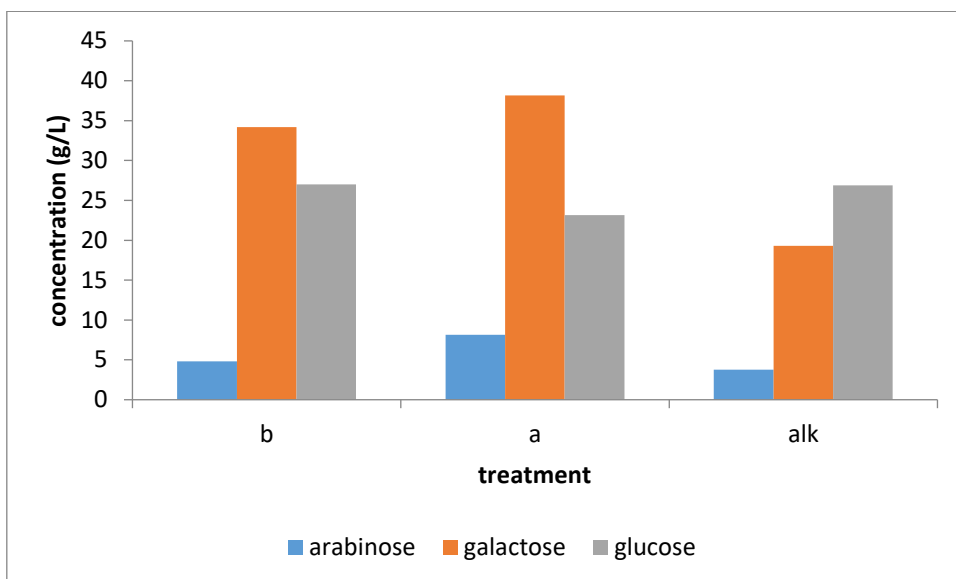


Fig 4. Release of sugars by acid and alkali pretreatment.

The blank contains 4.8074 g/L of arabinose, 34.1787 g/L of galactose and 27.0187 g/L of glucose. It can be observed that the acid sulfuric pretreatment is better than sodium hydroxide, acid pretreatment released concentration of arabinose, galactose and glucose about 8.1619, 38.1734 and 23.1359 g/L, and 3.7611, 19.2844, and 26.3885 g/L respectively for sodium hydroxide, however the concentration is higher in the blank than in the two pretreatments.

Time of pretreatment

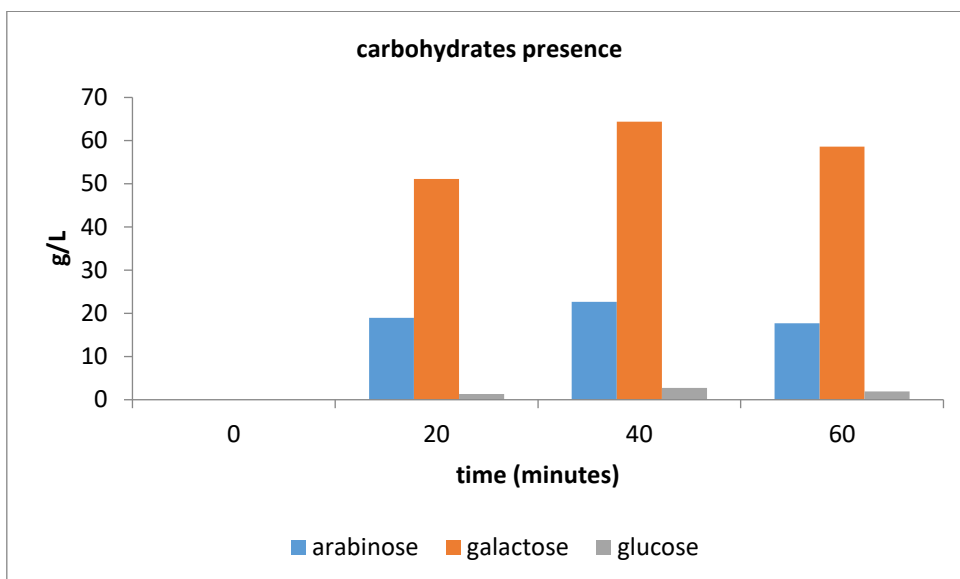


Fig 5. Monosaccharides concentration by time of pretreatment presence.

So many authors like Sluiter in 2010 suggest high temperature and long times (one hour about) like the best pretreatment to hydrolyze lignocellulosic material, however in this case the best time of pretreatment was at 40 minutes at 121°C and 15 lbs psi, it can be observed in the fig 5, that the concentration of the sugars analyzed are in most quantity at that time, and then decreased until 60 minutes, the most abundant sugar was galactose with 64 g/L, then arabinose with 22 g/L and finally glucose with 2.71 g/L, this results can be different with other authors because there are some aspects different between experiments like the species of coffee, concentration of the solvent, and solvents used.

***Saccharomyces cerevisiae* flask fermentation**

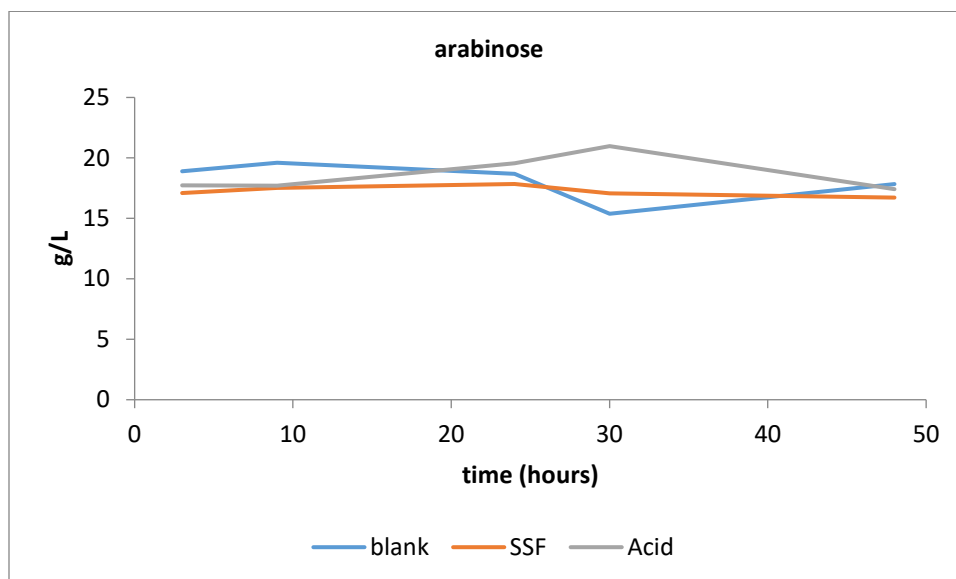


Fig 6. Concentration kinetic of arabinose.

It can be observed that the blank had an atypical behaviour because between the time 20 and 30 there is a decrease of arabinose of 5 g/L approximately, it could be a contamination of the media, or an error at the moment to analyze the sample, because after that at the end of the fermentation it increased again, in the case of the SSF and acid pretreatment shows the incapacity to consume this sugar, there is a little increase of arabinose in acid pretreatment near by the time 30 it may be a detection of another compound that was detected by the analysis. In general *Scerevisiae* couldn't consume arabinose.

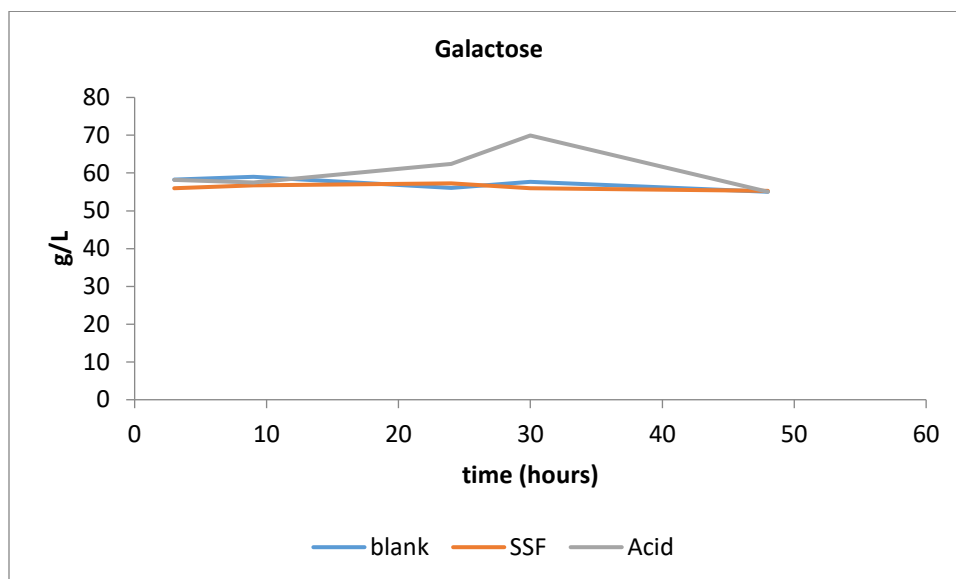


Fig 7. Concentration kinetic of galactose.

Again the fermentation with only acid pretreatment had an atypical behaviour, it can be caused for the detection of another compounds that are being grouped for the equipment, because in the case of the blank an SSF could not be consumed, *S. Cerevisiae* doesn't have this capacity.

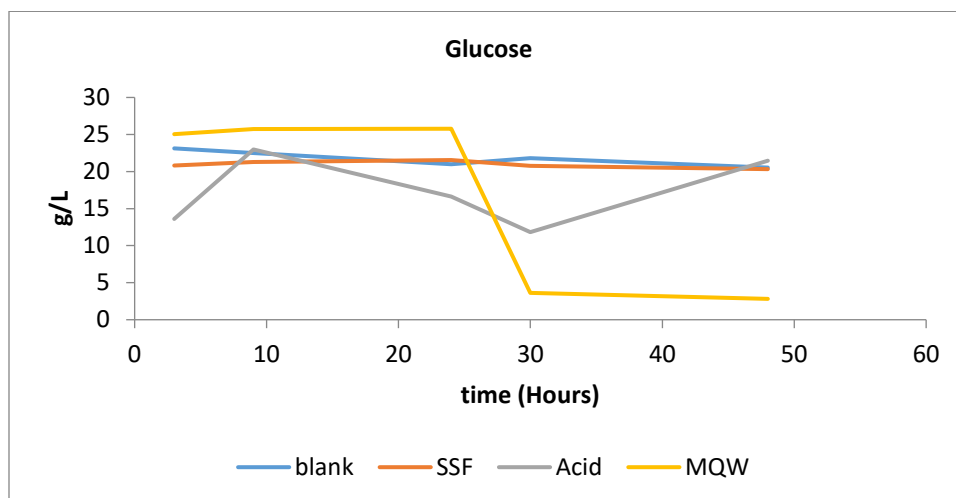


Fig 8. Concentration kinetic of glucose.

The consume of glucose was successfully only in the case of the sample with miliQ water, but it began at time 24, perhaps a problem of adaptation of the media, it was consumed totally at the end of the fermentation, in the other cases the glucose wasn't consumed with exception of the sample without enzyme that could consumed 10 g/L.

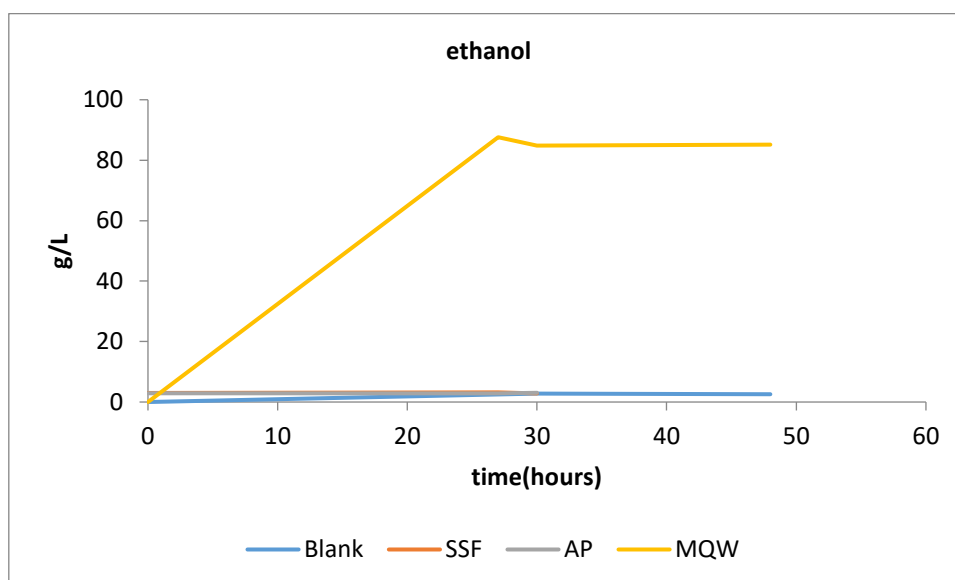


Fig 9. Production of ethanol in different conditions.

The production of ethanol was poor in the enzymatic-acid and acid pretreatment, the highest concentration in those case was 3.4 g/L for enzymatic-acid pretreatment replica number 2, apparently there's no a significative difference between the pretreatments, the yeast could be died for the ethanol concentration increase, pH changes or the recalcitrant compounds presence in the coffee produced for the previous acid heat pretreatment, however, the experiment with miliQ water and glucose showed the production of 87.6 g/L at time 27 and it coincide with the consume of glucose at that time.

In general *S. cerevisiae* didn't show good behaviour of consume of galactose an arabinose and ethanol production.

***Pichia stipitis* fermentation**

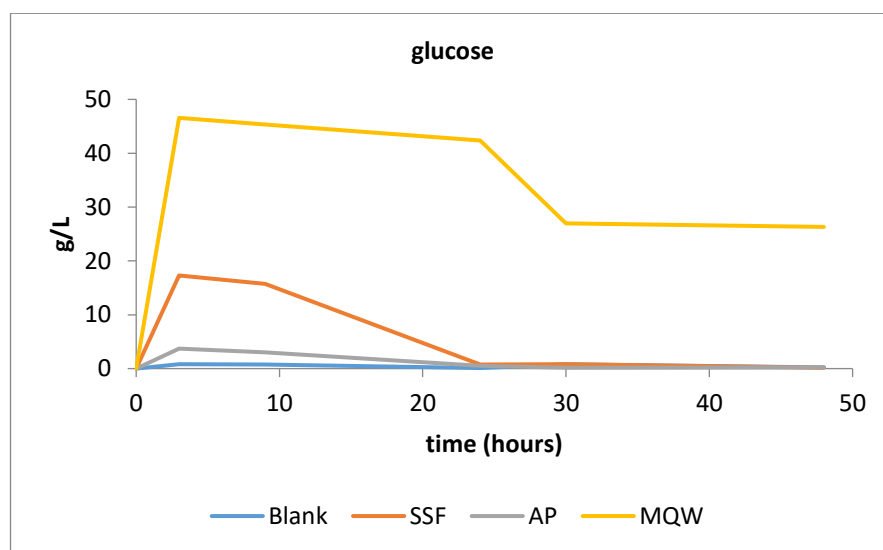


Fig 10. Kinetick of glucose consume

In both fermentation the glucose could be released and consumed, but in the case of SSF the releasing of glucose was major, 17 g/L and 3 g/L for acid pretreated sample, SSF was faster to release but acid was faster to consume it, the yeast

consumed all of the glucose in at 24 hours, in media with glucose didnt consumed all the glucose.

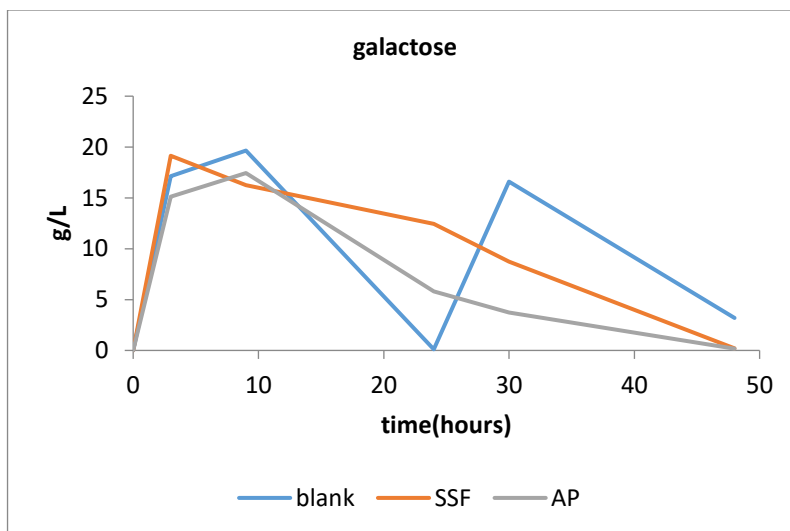


Fig 11. Kinetic of galactose consume.

The blank had an atipycal behaviour, it could be a contamination problem, in the case of SSF an acid pretreate samples have practically the same capacity of release and consume galactose, but withput enzyme the consume is faster, the concentration initial of galactose was 19 g/L and 15 g/L for SSF and acid pretreatment repectively, and consumed the totality at time 48.

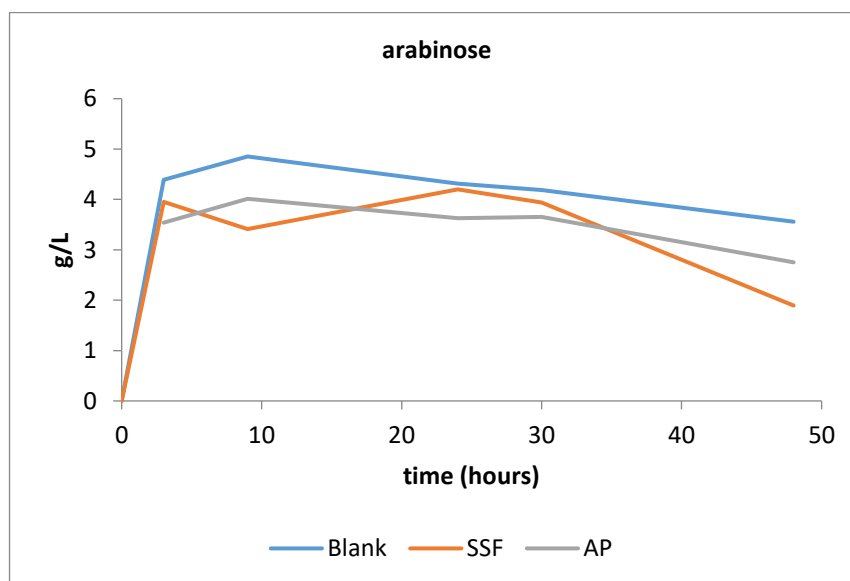


Fig. 12 kinetick of arabinose consume.

It can observed that in both cases *Pichia* had difficulties to consume arabinosa, regret of release 4.2 g/L and 4 g/L respectively of the monosaccharide, it only consumed a media of 1.5 g/L of arabinose.

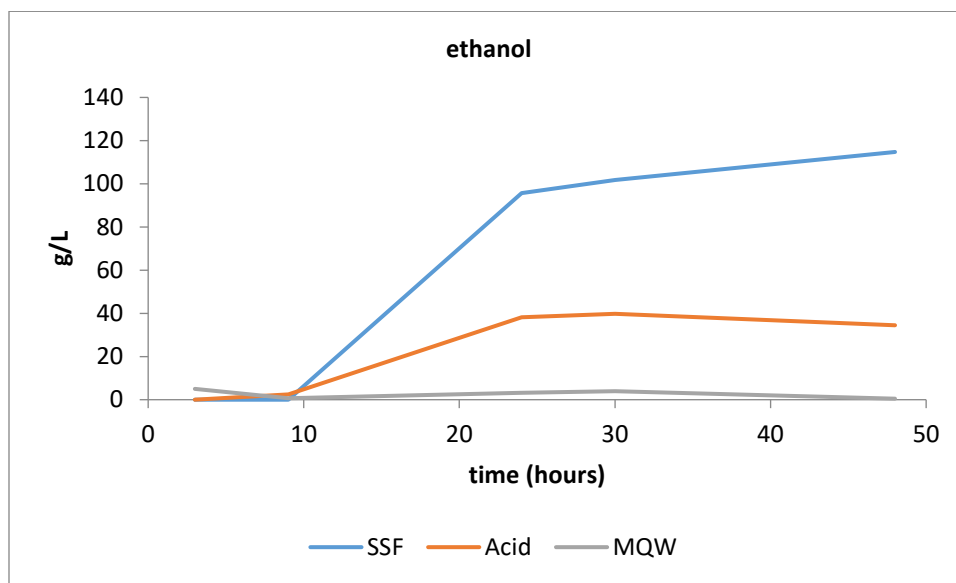


Fig 13. Production of ethanol

The SSF produced more concentration of ethanol than the acid and miliQ water the the acid process produced the major concentration of ethanol at time 30 (40 g/L) and SSF produced at the end of the fermentation 118 g/L of ethanol.

It howed the high capacity of *Pichia* to produce ethanol.

Dasbox fermentation

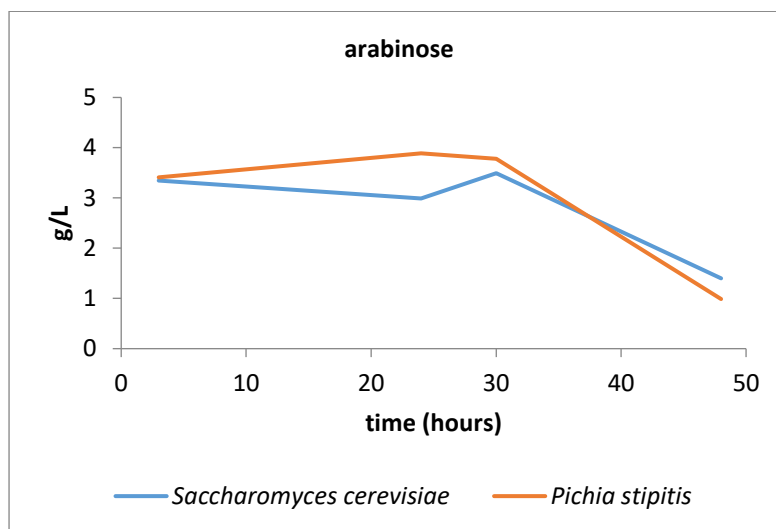


Fig 14. Behaviour of arabinose consume in Dasbox

S. cerevisiae had less capacity of consume arabinose than *Pichia*, However, both yeast used it after the 30 hours of the fermentation, it means that arabinose is not the first option to consume, the final concentration was of 1g/L for *Pichia* and 1.5 g/L for *S.cerevisiae*. the initial concentration was 3.2g/L.

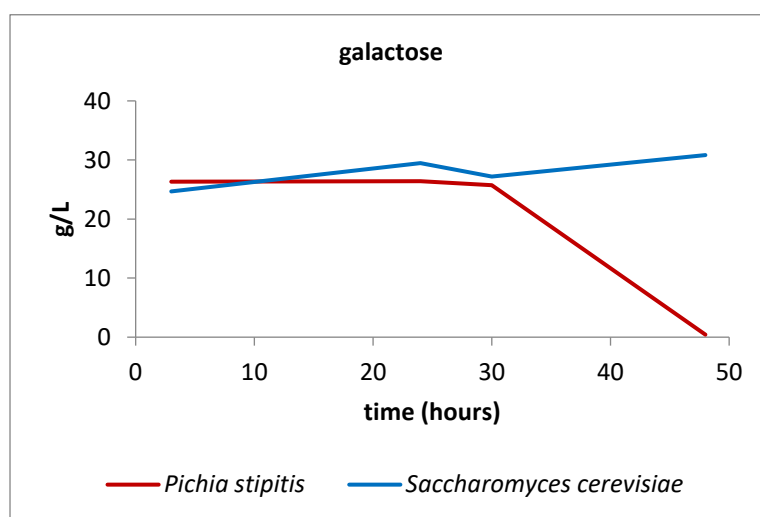


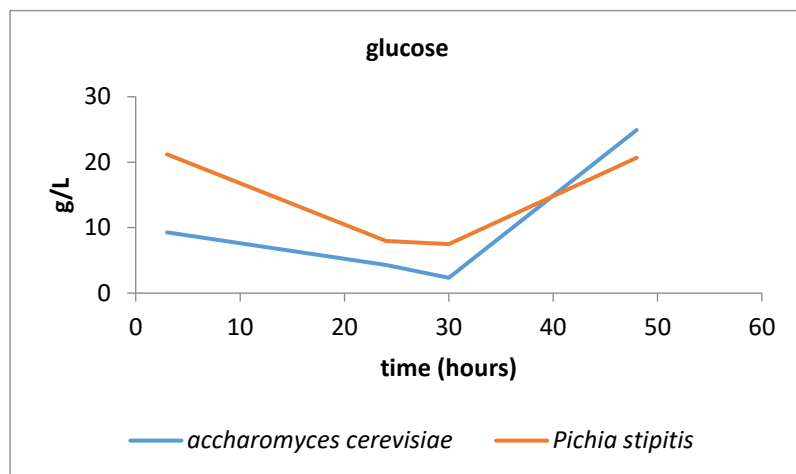
Fig 15. Behaviour of consume of galactose in Dasbox

In flask fermentation was observe that *S.cerevisiae* was not a good consumer of galactose, and the figure 15 confirm it, practically the concentration of galactose at

the end of the process is the same (25 g/L). In the case of *Pichia* began to consume after the time 30 but it was consumed in totality, it means that it consumed another monosaccharides first.

Fig 16. Behaviour of glucose in

Both yeasts have capacity of consume glucose, but *S. cerevisiae* was



consume
Dasbox

the

faster, it

for its incapacity of metabolize the galactose and arabinose, but it can be observed that there was an increase of the glucose in the time 30 for both yeasts, it is possible that the conditions in the media provide the degradation of fractions of cellulose and cause this increase or the equipment had detected another compounds similar in retention time and added at the glucose quantification, the initial concentration was 20 g/L and at time 30 was of 7 g/L approximately and at the end of the fermentation increase to 20 g/L again. despite the sugars were consumed, the yeast didn't produce ethanol.

In conclusion the best yeast to try SCG was *Pichia stipitis*, it had a good capacity to consume arabinose, galactose and glucose, but it had minor preference for arabinose, and high preference for galactose until finish to consume glucose, the enzyme didn't release high quantities of sugars, the best time to treat the CG was 40 minutes and the best pretreatment was with sulphuric acid, it is necessary to proof another conditions that improve the action or evaluate the possibility of change the enzyme, it is necessary to add an internal standard to check if the results of the HPLC are in the correct range, it can reduce interference between the lectures

and corrects the deviation, the capacitance of the Dasbox use is essential for the correct use and reliable results.

SCG has a high potential to exploit, it is possible to use it to produce biodiesel, it has near by 10% of oil, and bioethanol at the same time, and with the bagasse of it produce raw material like fertilizer or pellet for heating houses, because it has a 20% heat capacity more than wood.

Bibliography

- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Calero, Samantha Miranda, et al. "Análisis proximal de granos de arroz, frijol, maíz y café comercializados en el mercado Roberto Huembes de Managua." *Universidad y Ciencia* 9.14 (2017): 45-51.
- Noriega Salazar, Adrianayela, Ramón Silva Acuña, and Moraima García de Salcedo. "Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal." *Zootecnia Tropical* 27.2 (2009): 135-141.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. Food Bioprocess Technol (2014) 7: 3493. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., de Macedo, G. R., & Gonçalves, L. R. B. (2011). Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6), 929–943. doi:10.1007/s12010-011-9185-3
- Vásquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza, M. B., Jr., & Pereira, N., Jr. (2007). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136–140, 141–154

- Ma, H., Liu, W. W., Xing, C., Wua, Y. J., & Yu, Z. L. (2009). Bioresource Technology, 100, 1279–1274
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Calero, Samantha Miranda, et al. "Análisis proximal de granos de arroz, frijol, maíz y café comercializados en el mercado Roberto Huembes de Managua." *Universidad y Ciencia* 9.14 (2017): 45-51.
- Noriega Salazar, Adrianyla, Ramón Silva Acuña, and Moraima García de Salcedo. "Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal." *Zootecnia Tropical* 27.2 (2009): 135-141.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A. & Mussatto, S.I. Food Bioprocess Technol (2014) 7: 3493. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., de Macedo, G. R., & Gonçalves, L. R. B. (2011). Ethanol Production from Cashew Apple Bagasse: Improvement of Enzymatic Hydrolysis by Microwave-Assisted Alkali Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6), 929–943. doi:10.1007/s12010-011-9185-3
- Vásquez, M. P., Silva, J. N. C., Souza, M. B., Jr., & Pereira, N., Jr. (2007). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136–140, 141–154
- Ma, H., Liu, W. W., Xing, C., Wua, Y. J., & Yu, Z. L. (2009). Bioresource Technology, 100, 1279–1274
- J. Leif y M.Carlos. " Pretratamiento de lignocelulosa : formación de inhibidores por productos y estrategias para minimizando su efectos ". BioresourceTecnología. Vol. 199, pp. 103-112. 2016.
- Burton, Rachel, Xiaohu Fan y Greg Austic . " Evaluación de dos pasos reacción y enzima catálisis enfoques para la producción de biodiesel desde gastadocafé motivos ". *Revista Internacional de Energía Verde* 7.5 (2010): 530-536.
- 28 [] W. Seung, C. Eun, L. Dae-Seok, L. Soo, L. Young and B. Hyeun. "Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials". *Biotechnol. Biofuels*. Vol. 8 N° 228, pp. 3-11. 2015.
- 30 [] S. Muhammad, L. Jianghao, Z. Jiafu, H. Yan, W. Wen, C. Chang and L. Guangqing. "Improve the Anaerobic Biodegradability by Copretreatment of Thermal Alkali and Steam Explosion of Lignocellulosic Waste". *BioMed*



Research International. Vol. 2016. Article ID 2786598. 10 pages. 2016. DOI: 10.1155/2016/2786598.

- Mussatto , Solange I., et al. " Azúcares metabolismo y etanol producción por diferente levadura son desde café industria desechos hidrolizados ". *Aplicado Energía* 92 (2012): 763-768.
- Rizzuto, María Liliana Quintero, and Maritza Rosales. "El mercado mundial del café: tendencias recientes, estructura y estrategias de competitividad." *Visión Gerencial* 2 (2014): 291-307.