

Estudio comparativo de rendimiento y contenido de compuestos volátiles en un proceso de elaboración de Tequila a nivel industrial*

José Arnoldo López-Alvarez, Alma Laura Díaz-Pérez y Jesús Campos-García

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

Resumen

La fermentación alcohólica en el proceso de elaboración del tequila es una etapa de suma importancia, ya que influye en el rendimiento y en las características organolépticas del destilado alcohólico. En este trabajo se realizó un análisis comparativo del rendimiento y el contenido de compuestos volátiles producidos durante la fermentación de mostos de agave utilizando una levadura aislada de ambientes naturales, *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Pan1 que comúnmente es usada en la fermentación alcohólica en diversas empresas tequileras. Los resultados obtenidos en pruebas de fermentación a nivel industrial, la levadura UMPE-1 mostró una velocidad máxima de consumo de azúcares fermentables de 4.79 g/L*h y una producción de etanol 2.32 g/L*h, acumulando 54.2 g de etanol/L de mosto después de 72 h de fermentación; mientras que para la levadura Pan1, la riqueza alcohólica acumulada fue 39.4 g de etanol/L. Los rendimientos de producción alcohólica obtenidos con respecto a la concentración de azúcares fer-

*Una parte del contenido del trabajo contiene datos previamente publicados en J. Biosci. Bioeng. (2012) 113:614-618.

mentables, correspondieron a 96% para la levadura UMPe-1 y 70% para la levadura Pan1. Importantemente, se obtuvo un aumento en la proporción de los compuestos mayoritarios, así como de volátiles minoritarios presentes en el tequila. Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se identificaron 29 compuestos volátiles en el tequila utilizando la cepa UMPe-1, mientras que en el tequila obtenido usando la levadura Pan1 se encontró un menor número de compuestos volátiles y en bajas concentraciones. Los resultados de rendimiento y contenido de compuestos volátiles sugieren que la cepa UMPe-1 es una levadura adecuada para fermentación de mostos de agave, contribuyendo con el mejoramiento de las características organolépticas del tequila.

Palabras clave: *Agave tequilana*, *Kluyveromyces marxianus*, fermentación alcohólica, compuestos volátiles, tequila.

Abstract

Comparative study of yield and content of volatile compounds in a Tequila elaboration process at industrial level

Alcoholic fermentation in the production of tequila process is a very important step, since that influences the yield and organoleptic characteristics of the alcoholic distilled. In this work, was carried out a comparative analysis of the performance and content of volatile compounds produced during fermentation of agave must using a yeast isolated from natural environments, *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1, and a strain of *Saccharomyces cerevisiae* Pan1, that its commonly used in the alcoholic fermentation in tequila factories. The results obtained in industrial scale fermentation tests, the UMPe-1 yeast showed a maximum rate of fermentable sugars consumption of 4.79 g/L*h and ethanol production of 2.32 g/L*h, accumulating ethanol 54.2 g/L in must after 72 h of fermentation; while that 39.4 g of ethanol/L for the Pan1 yeast. Alcoholic yield obtained with respect to fermentable sugars content were 96% and 70% for the yeasts UMPe-1 and Pan1, respectively. For UMPe-1 strain was obtained ethanol yield with respect to fermentable sugars concentration of 96%, while that using the Pan1 yeast 70% yield. Importantly, an increment was obtained in the major compounds proportion, and in the minor volatile compounds in tequila UMPe-1-obtained. By GC-MS, 29 volatile compounds were identified in the tequila using UMPe-1 yeast, while in the tequila Pan1-obtained less volatile compounds and at low concentrations were found. Performance results and volatile compounds content suggest that the UMPe-1 strain is suitable yeast for agave must fermentation, contributing to improving the organoleptic characteristics of tequila.

Keywords: *Agave tequilana*, *Kluyveromyces marxianus*, alcoholic fermentation, volatile compounds, tequila.

Introducción

El tequila es la bebida destilada más importante que se produce en México, es obtenida de mostos fermentables de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), la cual es una planta endémica de México (Cedeño, 1995; Lappe-Oliveras, et al., 2008). Como en todos los procesos de producción de bebidas alcohólicas, existen variables de proceso que influyen en la productividad y calidad de las bebidas. Para el caso del tequila se pueden considerar, la edad y localización de cultivo de la planta de agave, la cocción de las piñas de agave, la fermentación, la destilación, el añejamiento y la formulación del producto final. En el caso de la fermentación, la levadura utilizada en el proceso y el método utilizado, así como el contenido de azúcares y otros componentes adicionados al mosto son variables que influyen en la productividad y características organolépticas del tequila. *S. cerevisiae* es la levadura que comúnmente se utiliza en la fermentación de jugos azucarados para la producción de bebidas alcohólicas (Cedeño, 1995). Para la producción de tequila, la fermentación natural y espontánea es una práctica común. Algunos productores de tequila suelen añadir un inóculo (levadura de panadería) como adyuvante, mientras que otros agregan un cultivo puro de levadura frecuentemente aislada y seleccionada para la producción de etanol (Lappe-Oliveras, et al., 2008). La fermentación natural se ha traducido en un menor rendimiento y calidad sensorial, debido a las variaciones en el proceso de producción entre cada lote, ocasionado por la presencia de varias especies endémicas de microorganismos en el mosto, tales como *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces* y *Hanseniaspora*, así como de bacterias de diversos géneros, las cuales compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos que genera una disminución en la producción de etanol ocasionando un destilado de baja calidad (Lachance, 1995; Lappe-Oliveras, et al., 2008). En este sentido, se conoce poco sobre los efectos de la o las levaduras en la calidad y el contenido de compuestos volátiles en la producción de tequila (Díaz-Montaño, 2008). Durante el proceso de cocción de las piñas de agave, se producen compuestos volátiles como por ejemplo, los compuestos de Maillard, además de los azúcares fermentables (principalmente fructosa y glucosa). Estos compuestos volátiles aunados a los producidos durante el proceso de fermentación asociados a la levadura usada o especies levaduriformes presentes pueden tener un impacto significativo sobre las características del tequila (Mancilla-Margalli y López, 2002; Arrizon et al., 2006; Díaz-Montaño, 2008; Pinal et al., 2009). Algunos estudios han descrito la caracterización de los compuestos volátiles contenidos en el tequila, donde alrededor de 175 diferentes compuestos han sido identificados. Los compuestos volátiles comúnmente son asociados con las propiedades organolépticas, sensoriales, aromáticas y el sabor de esta bebida (Vallejo-Cordoba et al., 2004); cuyo contenido y concentración en los destilados, entre otras variables, se sugiere que son producidos por la o las levaduras contenidas naturalmente o adicionadas en la fermentación del mosto de agave (Díaz-Montaño, et al., 2008). En este trabajo, se llevó a cabo un análisis comparativo de rendimiento y producción de compuestos volátiles en la etapa de fermentación, utilizando una cepa nativa de *K. marxianus* en compa-

ración con una cepa de *S. cerevisiae* que usualmente se utiliza para la fermentación de mostos de agave a nivel industrial.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas para fermentación de mostos

A partir de agave pútrido, agave fermentado y residuos de la destilación se obtuvieron 200 aislados levaduriformes. Los aislados de levaduras fueron seleccionadas y clasificadas de acuerdo a sus propiedades etanológicas; i.e., capacidad de utilizar eficazmente la glucosa y la fructosa en la fermentación de mostos de agave para producir etanol, osmotolerancia y tolerancia de etanol (López-Álvarez, 2007). Bajo el escrutinio referido fue seleccionada la levadura UMPe-1 la cual se catalogó por secuenciación de un fragmento de 550 nt de la región ribosomal 26S, la cual mostró una identidad del 99% con la especie de *Kluyveromyces marxianus*, lo anterior de acuerdo con alineamientos tipo Blast con la base de datos del NCBI. Con lo anterior se sugirió que la levadura UMPe-1 corresponde a la especie de *Kluyveromyces marxianus*, la cual fue denominada UMPe-1 y resguardada en la Colección de Cultivos Microbianos y Banco de Genes del Instituto de Tecnología Microbiana Chandigarh, India, MTCC 5309 (Campos-García, et al., 2007; Patente Mexicana MX/a/2007/014445, No. 271316). Para el estudio comparativo, en este trabajo se utilizó la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* Pan1 (obtenida de un proveedor comercial de levadura de panadería), la cual es comúnmente usada en la elaboración de tequila en la fábrica denominada "Altos Ciénega Unidos SPR de RL".

Pruebas de fermentación a nivel industrial

Las fermentaciones se llevaron a cabo en mostos azucarados obtenidos por la extracción de jugos de piñas de *Agave tequilana* Weber sometidas a cocción de acuerdo a las condiciones de proceso de la empresa "Altos Ciénega Unidos SPR de RL". El mosto de agave utilizado en las fermentaciones fue preparado a una concentración de sólidos disueltos de 14°Brix, el cual presentó un contenido de azúcares fermentables de 107.8 g/L (9.4% de glucosa, 88.6% de fructosa y 2% de otros azúcares). Las fermentaciones industriales se llevaron a cabo en tanques de 15,000 L con un volumen por tanque de 13,200 L de mosto. Los tanques fueron inoculados con 1000-1200 L de un cultivo de levadura previamente crecido a una densidad celular de 145×10^6 células/ml con el 98% de viabilidad. La fermentación se realizó a temperatura ambiente (20-28°C) durante 90 h.

Análisis de mostos fermentados

La producción de etanol y el consumo de azúcar en los mostos de agave se determinaron mediante un análisis de cromatografía de líquidos (HPLC; Varian Prostar), utilizando un detector de índice de refracción (Perkin-Elmer). Las muestras fermentadas se filtraron y

se inyectaron 25 μl para su análisis utilizando una columna Aminex HPC-87Ca (Bio-Rad). Las condiciones operativas fueron las siguientes: temperatura de la columna, 80°C, agua desionizada como fase móvil a 0.7 ml/min durante 20 min. La cuantificación se realizó utilizando curvas de calibración patrones de sacarosa, glucosa, fructosa y etanol como compuestos de referencia (Sigma-Aldrich), obteniendo un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0.99 para cada uno.

Determinación del contenido de compuestos mayoritarios y volátiles minoritarios en los destilados

Posterior a la fermentación, los mostos se sometieron a doble destilación de acuerdo con el procedimiento estándar seguido por la fábrica. El contenido de compuestos mayoritarios y volátiles minoritarios en la bebida destilada, la cual se conoce como "Tequila Blanco", se determinó por cromatografía de gases (GC) y GC-espectrometría de masas (GC-MS), respectivamente. Los compuestos mayoritarios se determinaron inyectando 1 μl en un GC (Hewlett-Packard 6890), equipado con un detector de ionización de llama (FID), y una columna capilar HP-5 (30 m X 0.30 mm ID y 0.25 μm) en modo splitless a 220°C. La temperatura del detector FID se mantuvo a 260°C y de la columna a 50 °C durante 2 minutos, después se aumentó a 240°C a 5°C/min y se mantuvo durante 15 min. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 1 ml/min. La cuantificación de los compuestos mayoritarios se basó en curvas de calibración para acetaldehído, acetato de etilo, metanol, n-propanol, alcohol isoamílico, isobutanol, n-butanol y 2-fenil etanol como estándares y usando el estándar interno 2-pentanol como factor de corrección (De León-Rodríguez et al., 2006). El análisis de compuestos volátiles minoritarios se llevó a cabo después de una micro destilación de los productos por extracción líquido-líquido con diclorometano. El procedimiento utilizado fue el siguiente: 15 ml de tequila se extrajo dos veces en proporción 1:2 (v/v) con diclorometano (Sigma). Los extractos orgánicos se redujeron a 2 ml utilizando un concentrador de Micro-Kuderna Danish (Supelco) (López-Álvarez, 2012). Se inyectó 1 μl del concentrado en un GC (Agilent 6850) equipado con un detector MS (Agilent 5973), equipado con una columna capilar HP-FFAP (30 mm X 0.25 mm ID y 0.25 μm ; Agilent). Helio como gas acarreador a un flujo de 1 ml/min, las temperaturas del inyector y detector fueron 180°C y 230°C, respectivamente. La temperatura del horno se programó para iniciar a 40°C durante 3 minutos, después se elevó 3°C/min hasta 220°C, manteniendo durante 5 min. El espectrómetro de masas se usó a un voltaje de ionización de 70 eV y la determinación de masas fue entre 30 y 500 m/z. Los compuestos fueron identificados por comparación con los espectros de masas en la biblioteca (NIST-ChemStation, Agilent).

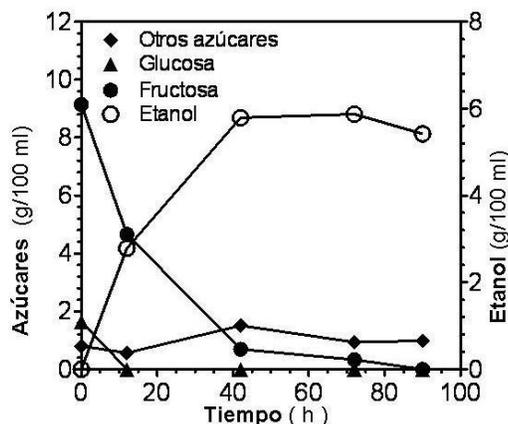


Figura 1. Fermentación por lote a nivel industrial (13,200 L) de mostos de agave por la levadura de *K. marxianus* UMPe-1. El consumo de azúcares y producción alcohólica en los mostos de agave fueron determinados por HPLC como se describe en Materiales y Métodos. La fermentación se realizó a temperatura ambiente (20 a 28°C) durante 90 h.

Resultados y Discusión

Fermentación por lote de mostos de agave por la cepa de *K. marxianus* UMPe-1

El contenido de azúcar en el mosto de agave utilizado para la elaboración de tequila comúnmente oscila entre 40 y 140 g/L de azúcares fermentables (que contiene alrededor de 9-15% de glucosa, 80-92% de fructosa y 2-5% de otros azúcares). Resultados de osmotolerancia indican que la levadura *K. marxianus* UMPe-1 puede utilizarse para fermentación del mosto de agave con concentraciones de hasta 220 g/L de azúcares fermentables, sin presentarse efectos inhibitorios sobre el crecimiento ni sobre la fermentación alcohólica (Campos-García et al., 2007). Una vez sorteado las pruebas de fermentación a nivel laboratorio y piloto, mostrando eficiencias de conversión alcohólica de 92% y 94%, respectivamente (López-Álvarez et al., 2012); se procedió a llevar a cabo la fermentación a nivel industrial. El consumo de azúcares como del etanol producido indican que la mayor velocidad de fermentación se llevó a cabo en las primeras 32 h de fermentación. La cepa de levadura *K. marxianus* UMPe-1 mostró una tasa de consumo máximo de azúcares de 4.79 g/L*h, con una producción de etanol máxima de 2.32 g/L*h (Fig. 1). Es de importancia hacer notar que la fructosa y la glucosa presente en el mosto de agave fue consumida en su totalidad después de 72-90 h de proceso. Sin embargo, se encontró que existe la producción de compuestos de naturaleza polisacárida (Fig.1). Estos datos sugieren que en la fermentación de mostos de agave por la levadura UMPe-1 es probable que exista la producción de algunos polisacáridos como levanas o bien exista la hidrólisis de polímeros de celulosa presentes en los mostos. Con los resultados obtenidos se realizó el cálculo de la riqueza alcohólica acu-

mulada en los tanques de fermentación, el cual indicó que la levadura de *K. marxianus* UMPE-1 presentó una riqueza alcohólica de 5.42 g/100 ml, mientras que comparativamente, la levadura de *S. cerevisiae* Pan1 presentó una riqueza alcohólica en los mostos de agave de 3.94 g/100 ml (Fig. 2A). Otro parámetro determinado en la fermentación fue el rendimiento alcohólico, el cual se determina en base a los azúcares fermentables contenidos en el mosto, que son transformados a alcoholes (usualmente etanol). Los resultados indicaron que la cepa de *K. marxianus* UMPE-1 obtuvo un rendimiento alcohólico de 96% en comparación con un 70% obtenido por la cepa de *S. cerevisiae* Pan1 (Fig. 2B). Finalmente, una vez que se destiló el producto se determinó el rendimiento del proceso. En este parámetro se determinó la cantidad de destilado (Tequila Blanco) a una riqueza alcohólica de 55 °Alc., producido al final del proceso, por kilogramo de agave crudo utilizado en su elaboración. En este respecto, se encontró que el aislado de *K. marxianus* UMPE-1 presentó un consumo de 6.4 kg de agave por litro de destilado a 55 °Alc. producido, mientras que la levadura de *S. cerevisiae* Pan1 presentó un consumo de 8.5 kg de agave por litro de destilado (Fig. 2C).

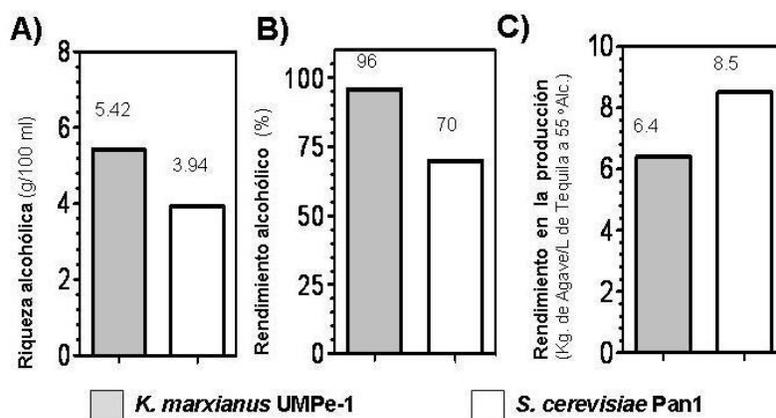


Figura 2.- Rendimientos obtenidos en el proceso de fermentación de mostos de agave por las levaduras de *K. marxianus* UMPE-1 y *S. cerevisiae* Pan1. A) Riqueza alcohólica determinada en el mosto de agave. B) Rendimiento alcohólico representado en porcentaje del rendimiento teórico obtenido a partir del contenido de azúcares fermentables. C) Rendimiento de la productividad final obtenida en la prueba industrial, expresado en kilogramos de agave crudo requeridos para la obtención de un litro de Tequila a una riqueza alcohólica de 55 °Alc. vol.

La cepa de *K. marxianus* UMPE-1 fue más eficiente en la fermentación de los mostos de agave (rendimiento de 96%), mientras que para la cepa de *S. cerevisiae* Pan1 su rendimiento fue 70%. El rendimiento del proceso en base a la materia prima consumida representó un ahorro de 25% al utilizar la levadura UMPE-1, respecto a la Pan1. Los datos obtenidos del rendimiento en la conversión de azúcares a etanol en la elaboración del destilado indican que en el proceso de fermentación de mostos, la levadura de *K. marxianus* UMPE-1 puede

ser utilizada como organismo fermentador para mejorar la productividad en destilerías de tequila.

	Compuesto (mg/100 ml)		Aumento/disminución (veces)**
	<i>K. marxianus</i> UMPe-1	<i>S. cerevisiae</i> Pan1	
Etanol	NC	NC	0.0
N-Propanol	75	20	3.7
Isobutanol	115	30	3.8
Alcohol isoamílico	306	50	6.1
2-Pentanol*	76	10	7.6
Metanol	314	350	-0.1
Acetaldehído	7.4	10	-0.25
n-Butanol	2.0	12	-6.0
Acetato de etilo	2.6	15	-5.7
Lactato de etilo	3.0	20	-6.6

Los datos fueron obtenidos por inyección de 1 µl del destilado "Tequila blanco" obtenido a 55°Alc. Vol. En un cromatógrafo de gases. * Estandar interno usado como factor de corrección en la cuantificación. ** Signo negativo indica disminución en UMPe-1 respecto a Pan1. NC, no cuantificado.

Contenido de compuestos mayoritarios en el Tequila

La calidad organoléptica de los licores destilados producto de la fermentación de jugos azucarados es uno de los parámetros de mayor importancia en la calidad de las formulaciones (Arrizon et al., 2006). Con la finalidad de analizar la calidad organoléptica del producto obtenido (Tequila Blanco) al utilizar las cepas de *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Pan1, se analizaron los componentes mayoritarios y el contenido de volátiles de los destilados obtenidos bajo las mismas condiciones de destilación utilizadas en la fábrica. Estudios al respecto sugieren que los compuestos mayoritarios (alcoholes superiores y los ésteres) son en primera instancia los que contribuyen con la calidad organoléptica de las bebidas obtenidas de agave (Vallejo-Cordoba et al., 2004; De León-Rodríguez et al., 2006; Díaz-Montaño et al., 2008). El análisis mediante GC indicó que el contenido de compuestos mayoritarios en el "tequila blanco" obtenido de la fermentación de mostos por la cepa *K. marxianus* UMPe-1 fueron incrementados entre 3.7 a 7.6 veces (compuestos como n-propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y 2-pentanol), respecto a los obtenidos por la cepa de *S. cere-*

visiae Pan1 (Tabla 1). Por el contrario, en el destilado obtenido de la fermentación por la levadura UMPE-1 se encontró que disminuyó el contenido de los compuestos n-butanol, acetato de etilo y lactato de etilo, en el rango de (5.7 a 6.6 veces), respecto a la levadura Pan-1 (Tabla 1). Los resultados sugieren que el destilado obtenido a partir de la levadura *K. marxianus* UMPE-1 posee una menor proporción de compuestos que le proporcionan al producto final características poco deseables, como son aromas característicos de solventes, dados principalmente por el acetato de etilo, lactato de etilo y n-butanol. Por el contrario, se ha sugerido que compuestos como alcohol isoamílico y 2-pentanol, se relacionan con destilados ricos en aromas y consistencia agradables (Vallejo-Cordoba et al., 2004; Arrizon et al., 2006; De León-Rodríguez et al., 2006; López-Álvarez et al., 2012), lo que generaría una mayor calidad organoléptica para el destilado procedente de la levadura UMPE-1 que el producto obtenido por la cepa Pan1 (López-Álvarez et al., 2012).

Contenido de compuestos volátiles minoritarios en el Tequila

Adicionalmente al contenido de compuestos mayoritarios, los compuestos volátiles minoritarios presentes en el destilado se consideran de suma importancia para las características organolépticas (aromas, sabores y consistencia) otorgadas al Tequila o cualquier otro licor (Vallejo-Cordoba et al., 2004; De León-Rodríguez et al., 2006; López-Álvarez et al., 2012). Por lo anterior, se realizó un análisis comparativo de compuestos volátiles minoritarios presentes en los productos destilados obtenidos a partir de las levaduras de *K. marxianus* UMPE-1 y de *S. cerevisiae* Pan1. Para estos análisis, los compuestos predominantes fueron eliminados del producto destilado mediante una extracción líquido-líquido y subsecuente micro-destilación como se ha descrito (Vallejo-Cordoba, 2004). Los resultados indicaron que la abundancia en compuestos volátiles minoritarios fue mayor en el producto destilado obtenido del mosto fermentado por *K. marxianus* UMPE-1 que en el procedente de la fermentación con la levadura *S. cerevisiae* Pan1, encontrándose alrededor de 29 compuestos diferentes y en concentraciones incrementadas (Figura 3). De los volátiles identificados, 22 de estos compuestos fueron encontrados con bajas concentraciones en la bebida obtenida de la levadura de *S. cerevisiae* Pan1. Comparativamente, los compuestos volátiles presentes en los destilados de la cepa de *K. marxianus* UMPE-1 y no encontrados en la levadura *S. cerevisiae* Pan1 fueron: 3-metil-3-butenol, 3-metil-1-pentanol y terpenos como linalol, nerolidol y timol; todos éstos del grupo de los terpenos. Se ha descrito que el contenido de terpenos puede influir en las características aromáticas de las bebidas (Vallejo-Cordoba et al., 2004; De León-Rodríguez et al., 2006). Por otro lado, el contenido de ésteres en el Tequila blanco o cualquier otro destilado, es asociado también con sabores afrutados agradables al paladar (Vallejo-Cordoba et al., 2004). Los resultados indican que los ésteres estuvieron presentes en concentraciones mayores en el Tequila obtenido de la fermentación con *K. marxianus* UMPE-1 en comparación con el obtenido de la levadura Pan1. Los ésteres identificados fueron: 2-hidroxietil-propionato, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de 2-fenil-etilo y dodecanoato de etilo (Figura 3). Adicionalmente, otros compuestos volátiles que fueron encontrados en mayor proporción en la fermentación con UMPE-1 con res-

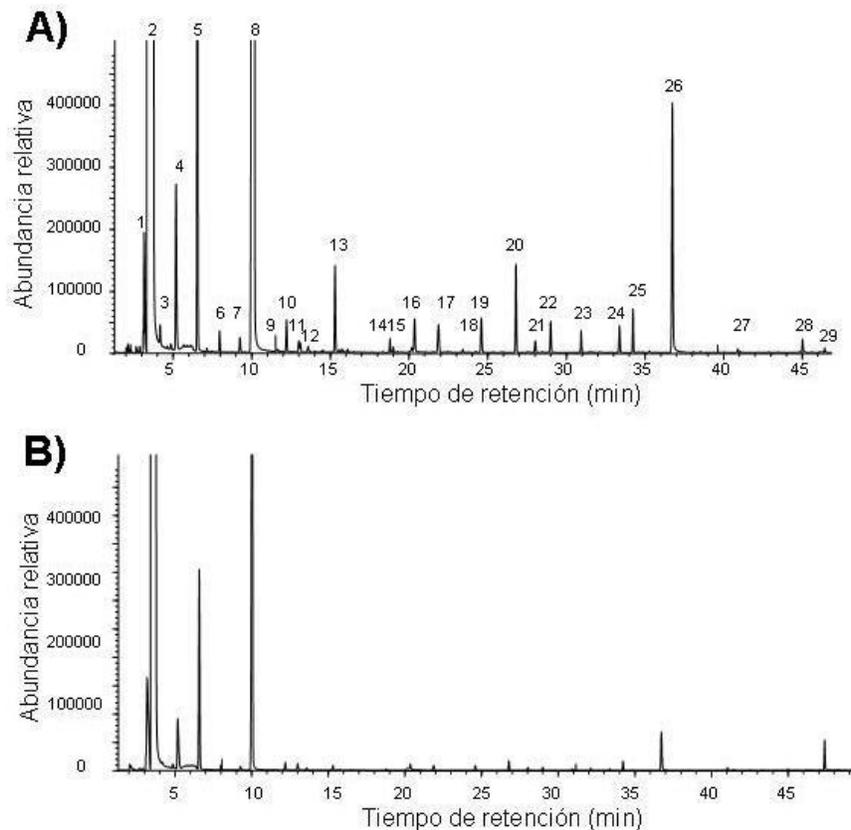


Figura 3.- Análisis de compuestos volátiles minoritarios contenidos en el Tequila obtenido a partir de la fermentación de mostos de agave, realizada con las levaduras de *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Pan1. Los datos fueron obtenidos por GC-MS y la identificación de los compuestos mediante la base de datos NIST-MS, presentando identidades 96%. Los números indican los compuestos identificados: 1) 1,2-butanediol, 2) etanol, 3) 2,3-butanediona, 4) 1-propanol, 5) 2-metil-1-propanol, 6) 1-butanol, 7) ciclo-pentanona, 8) 3-metil-1-butanol, 9) 3-metil-buten-1-ol, 10) 3(2H)-dihidro-2-metil-furanona, 11) 4-penten-1-ol, 12) 3-metil-1-pentanol, 13) 2-hidroxi-propanoil-etil-éster, 14) octanoil-etil-éster, 15) cis-óxido-linalol, 16) furfural, 17) 1-(2-furanil)-etanona, 18) linalool, 19) 5-metil-2-furancarboxaldehído, 20) deca-noil-etil-éster, 21) 2-furanmetanol, 22) (+)-alfa-terpineol, 23) desconocido, 24) 2-feniletil-acetil-éster, 25) dodeca-noil-etil-éster, 26) fenil-etanol, 27) nerolidol, 28) 1-hexadecanol, 29) timol.

pecto a la fermentación con Pan1 son: 2,3-butanodiona, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, dihidro-2-metil 3-(2H)-furanona, acetilfurano, 5-metil-2-furancarboxaldehído, (+) α -terpenol, alcohol fenil-etílico y 1-hexadecanol (Figura 2). Interesantemente, estos compuestos han sido identificados en destilados de agave y tequila que fueron añejados en barricas de roble (Vallejo-Cordoba et al., 2004), lo que significa que aún sin ser sometido

al proceso de añejamiento, se produce un destilado rico en compuestos volátiles que le proporcionan a la bebida una mayor calidad organoléptica. En conclusión, los resultados de rendimiento alcohólico obtenido en la fermentación y el aumento significativo en el contenido de los compuestos mayoritarios y de volátiles minoritarios que están asociados a la calidad organoléptica del tequila, sugieren que *K. marxianus* UMPe-1 puede ser considerada como un adecuado biocatalizador para la elaboración industrial del tequila en sustitución de cepas de uso común como *S. cerevisiae* Pan1.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por el CONACYT (106567) y CIC 2.14/UMSNH. Se agradece a Altos Ciénega Unidos SPR de RL y A. González García por las facilidades otorgadas para las pruebas industriales.

Bibliografía

1. Arrizon, J., F. Concetta, G. Acosta, P. Romano, y A. Gschaedler. 2006. Fermentation behaviour and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 89: 181-189.
2. Campos-García, J., C. Sosa, H. Reyes de la Cruz y A. López-Alvarez. 2009. Levadura fermentadora para la elaboración de bebidas alcohólicas (Tequila, mezcal, vino, ron, charanda y otros destilados). Patente: MX/a/2007/014445, No. 271316.
3. Cedeño, M. 1995. Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:1-11.
4. De León-Rodríguez, A., L. González-Hernández, A. Barba de la Rosa, P. Escalante-Minakata y M. López. 2006. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 22:1337-1341.
5. Díaz-Montaño, D., D. Marie-Line, M. Estarrón-Espinosa y P. Strehaiano. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme Microbiol. Technol.* 42: 608-616.
6. Lachance, M. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 68:151-160.
7. Lappe-Oliveras, P., R. Moreno-Terrazas, J. Arrizón-Gaviño, T. Herrera-Suárez, A. García-Mendoza, y A. Gschaedler-Mathis. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8:1037-1052.
8. López Alvarez, A. 2007. Obtención de cepas de levaduras tolerantes y sobreproductoras de etanol. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.

9. López-Alvarez, A., A.L. Díaz-Pérez, C. Sosa-Aguirre, L. Macías-Rodríguez y J. Campos-García. 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J. Biosci. Bioeng.* 113:614-618.
10. Mancilla-Margalli, N., y M. López. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul, *J. Agric. Food Chem.* 50: 806–812.
11. Pinal, L., E. Cornejo, M. Arellano, E. Herrera, L. Nuñez, J. Arrizon y A. Gschaedler. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 655-661.
12. Vallejo-Cordoba, B., A. González-Córdova, M. Estrada-Montoya. 2004. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase micro-extraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52:5567-5571.

