

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS



**AISLAR, IDENTIFICAR Y
CLASIFICAR LAS LEVADURAS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA DEL
SOTOL (*DASYLIRION SSP.*)**

**POR:
MARIA DEL CARMEN DOMÍNGUEZ IBARRA**

TESIS

Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener El Título De:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista Saltillo Coahuila México, Mayo del 2006

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS

**AISLAR, IDENTIFICAR Y
CLASIFICAR LAS LEVADURAS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA DEL
SOTOL (*DASYLIRION SSP.*)**

POR:

MARIA DEL CARMEN DOMINGUEZ IBARRA

TESIS

Que se somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de tesis

M.C. Oscar Noe Reboloso Padilla

Presidente del jurado

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Vocal

Dra. Dulce María Díaz Montaña

Vocal

Dr. Ramiro López Trujillo

Vocal suplente

Dr. Ramón F. García Castillo

Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista Saltillo Coahuila México, Mayo 2006

La presente investigación se llevo acabo en los Laboratorios de Fitopatología del Departamento de Parasitología. Y en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Nutrición y Alimentos. En coordinación del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco A.C. Bajo la dirección y coordinación de:

Dr. Gabriel Gallegos Morales
Asesor Principal

Dra. Dulce Maria Díaz Montaña
Co-asesor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi **padre Dios** todo poderoso por prestarme este tiempo vida e iluminarme en el transcurso de la realización de esta investigación.

A mi padres Sr. **José Domínguez Reyes †** Y Sra. **Reyna Ibarra Miranda** por darme la vida, por creer en mi y la confianza que me dieron al dejarme volar sola del nido, Gracias Padre mío por haberme querido como me quisiste, por todos los momentos felices que me regalaste y por todo el apoyo que me diste desde que nací. Madre gracias por todos los regaños que me das, pero yo se, que lo que me dices es por mi bien, te adoro. Y a la abuela que siempre a estado con nosotros y por haberme dado un padre tan divino Gracias yoyo.

A mis hermanas y hermanos **Isabel, Toña, Moy, Pedro** por su gran apoyo económico y moral en toda mi vida por sus consejos y motivaciones que me dan para seguirme superando profesionalmente y como ser humano, por esto y muchas cosas que hemos vivido como hermanos y como familia Gracias. Espero que todo lo que esperen de mi se los cumpla, queriditos

A mi **alma mater** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Por darme la oportunidad de lograr un sueño tan acariciado de mi vida personal.

A **Angélica Gutiérrez Ramos †** por abrirme las puertas de su casa, para darme su apoyo confianza y cariño en mi estancia en Saltillo y gracias a Dios por el tiempo que compartí con ella.

A los profesores que me formaron profesionalmente con sus cátedras, sus consejos y me alentaron para seguir adelante Federico Facio Parra, Ma. de Lourdes M., Amador Garza Quintanilla, Maria Hernández, Xochitl Ruelas, Antonio Aguilera, Carmen Julia, a la Maestra Martha Clarisa Coss por los buenos consejos que me dio en mi tiempo de estudiante y por creer en mi.

A los señores sotoleros de la región de Cedros Zacatecas Sra. Carmela Briones, Sr. Pablo Martínez por la facilidades prestadas para la extracción de muestras y por la hospitalidad que me brinda al llegar a Cedros.

Al **Ing. Antonio Ramírez** por su colaboración para la realización del trabajo la cual fue mucha importancia

Al Departamento de Parasitología en especial al Laboratorio de Fitopatología Licenciatura por el gran apoyo en la realización de este trabajo **MC. Elizabeth Galindo Cepeda y Cristina Sánchez.**

Al Departamento de Nutrición y Alimentos por la disposición para la realización del trabajo y al laboratorista Carlos Arévalo Sanmiguel por su paciencia y colaboración.

A la **Dra. Dulce Maria Díaz Montaña** por su gran disposición y apoyo que me dio, en la realización de la presente investigación, su ayuda fue de mucha importancia para la culminación.

Al **MC. Oscar Noe Reboloso** por la ayuda que me brindo en el presente trabajo, y por creer en mí para la terminación de este.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales** por mostrarme el mundo de los microorganismos a través de su literatura, conocimientos y guiarme en el trabajo de laboratorio, Gracias Doc. Sin su ayuda no se hubiera logrado este trabajo.

A la maestra **Laura Olivia Fuentes Lara**, por brindarme su amistad, por regalarme siempre una sonrisa y sobre todo por guiarme en el trabajo de Laboratorio.

Al **Dr. Ramiro Trujillo** por haber aceptado formar parte del jurado calificador.

A la **Biol. Guillermina Reyna Sustaita** por su gran apoyo, esfuerzo y dedicación que demostró para conmigo en la presente investigación. Y por toda la confianza que deposito en mi, gracias Guille por la amista que me ofrendas (por que tiene tres rayitas, destroyer).

Al **MC. José Ángel Daniel** por las atenciones prestadas en la realización del presente trabajo, y por soportarme en el transcurso de mi estancia en Saltillo. Y a su esposa por abrir las puertas de su casa para recibirme.

Al **Ing. Gustavo Velázquez T** por su paciencia cariño y comprensión que me tiene gracias por preocuparte en mi superación profesional y espiritual y por el gran amor que me tienes.

A mis amigos de la Narro por darme su amistad sincera y regalarme un momento de su tiempo, Noe Barrarera M. Alejandra Torres G. Perla Cerda, memo, a las primas Ma de Jesús Ramírez, Angélica (gellitus), Lupita. Cantonga Álvaro y Mirna.

A mi gran amigo **Heberto González P.** por su gran amistad que me brindo en el tiempo de estudiante, por el camino que recorrió a mi lado en el trabajo de laboratorio, gracias Beto por todas las atenciones que me entregaste en todo este tiempo que compartimos juntos (nuestro oscuro pasado).

A mis amigos y amigas de Saltillo Xochitl fuentes, Patricia Coronado, Rosita, Beatriz (Betina) por darme su confianza y regalarme su amistad.

A la **Familia de los Capri** por acogerme en su seno familiar Rosy, Capri, Jenny, Kurt, Wamble, Hunna y la familia Hinojosa Sr. Raúl, Sra. Laura, Norma y Raulito por hacerme un lugar en su familia gracias.

DEDICATORIAS

Con todo mi ser dedico la realización de este trabajo a mi Dios omnipotente por su infinito amor para conmigo, por todo el dolor y felicidad que me ha dado en este tiempo y espacio.

Dedico este logro que hoy llega a feliz término a todos mis seres queridos que un día creyeron en mí y que pusieron sus esperanzas su confianza y sobre todo su desmesurado amor. Mi padre. **José Domínguez Reyes †** que con su sabia sabiduría me dio las armas y las fuerzas para seguir en el sendero de la vida, ante la adversidad y la felicidad siempre tengo a quien recurrir, aunque no te tenga físicamente te llevo en mi corazón y en mi mente, aun me duele tu partida el consuelo que me queda es el de poder verte pronto, TE AMO papá pepe.(Y si quiero chillo).Mi madre una mujer trabajadora que no se rinde que siempre esta al pendiente de nosotros **Reyna Ibarra Miranda** Dios te guarde por siempre madre mía.

Te dedico este proyecto que iniciamos juntos que compartiste conmigo con tu ayuda moral económica y desinteresada a ti que estas cuando mas te necesito que me tiendes la mano y me das consuelo, hermano **Moisés Domínguez Ibarra**.

A mi hermana **Ma Antonieta** por ser la hermana comprensiva que no guarda rencores y que estas siempre que te llamo.

A mi hermana **Ma Isabel** la distancia no es obstáculo para saber que nos tenemos, por todos los bonitos momentos que compartimos y los no tan bonitos que tu solo logras conseguir. Por saber robar una sonrisa o un enojo y por las hermosas niñas que has hecho y las o los que te faltan, te quiero mucho.

A mis sobrinas y sobrino **David Gricel, Itzia, Faty, Nicole, Samantha** por ser la alegría de la casa e invitarlas a que luchen por sus sueños para que se hagan realidad.

A **Pedro** por ser mi hermano aunque creas que no te quiero

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	VI
INDICE GENERAL	VII
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS	XII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN	3
GENERAL	4
ESPECIFICOS:	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Generalidades sobre bebidas destiladas	5
2.1.1 Antecedentes de la destilación	5
2.1.2 Destilación	6
2.1.3 Clasificación de las bebidas alcohólicas	7
2.1.4 Congenéricos	8
2.1.5 Denominación de origen	10
2.2. Fermentación	11
2.2.1 Definición	11
2.2.2 Antecedentes de la fermentación	11
2.2.3 Fermentación alcohólica	11
2.2.4 Carbohidratos fermentables por las levaduras	14
2.2.5 Factores que afectan la fermentación	14
2.2.5.1 Temperatura	14
2.2.4.3 pH	15
2.2.5.4 Nutrientes activadores	15
2.2.5.5 Inhibidores	16
2.2.5.6 Concentración inicial de azúcares	16
2.3 Fermentación espontánea	17
2.3.1 Importancia del aislamiento	17
2.3.2 La identificación de las levaduras	18
2.3.2.1 Métodos de identificación de las levaduras	19
2.3.2.2 Análisis de proteínas	19
2.3.2.3 Cromatografía de gases	19
2.3.2.4. Rapd	19
2.3.2.5 Análisis genómico	20
2.3.2.6 La esporogénesis como característica de especie	20
2.4 Usos de las levaduras	20
2.5 Las levaduras	21
2.5.1 Morfología de las células	22
2.5.2 Forma de reproducción	22
2.5.2.1 Levaduras esporógenas	23
2.5.3 Composición química de las levaduras	23
2.5.4 Enzimas de la levadura	24
2.5.5 Asimilación de nutrientes en las levaduras	25
2.5.5.1 Definición	25

2.5.5.2 Asimilación Nitrógeno.....	25
2.5.5.3 Asimilación de Carbono.....	26
2.5.6 Desasimilación en las levaduras.....	26
2.6 Factores que afectan a las levaduras.....	27
2.6.1 Agua.....	27
2.6.2 Oxígeno.....	27
2.6.3 Temperatura.....	27
2.6.4 Luz.....	28
2.6.5 pH.....	28
2.6.6 Potencial de oxido- reducción.....	28
2.6.7 Tóxicos.....	29
2.6.8 Nitratos.....	29
2.7 Levaduras industriales de la fermentación alcohólica.....	29
2.7.1 Levaduras apiculadas pendiente.....	30
2.7.2 Levaduras que forman película.....	30
2.8 Propiedades tecnológicas de las levaduras.....	30
2.8.1 Tolerancia al etanol.....	30
2.8.2 Floculación.....	31
2.8.3 Resistencia a las toxinas.....	31
2.9 Generalidades sobre sotol.....	32
2.9.1 Descripción botánica.....	32
2.9.2 Antecedentes del sotol.....	33
2.9.3 Otros usos del sotol.....	34
2.9.4 Sotol.....	34
2.9.4.1 Definición de sotol.....	34
2.9.5 Tipos de sotol.....	35
2.9.5.1 Sotol blanco.....	35
2.9.5.2 Sotol joven.....	35
2.9.5.3 Sotol reposado.....	35
2.9.6 Elaboración artesanal de sotol en Cedros Zacatecas.....	36
2.9.6.1 Corte de sotol y Recepción.....	38
2.9.6.2 Cocimiento y molienda de sotol.....	38
2.9.6.3 Preparación del mosto y fermentación.....	40
2.9.6.4 Destilación.....	41
2.9.6.5. Almacén y dilución del sotol.....	43
2.9.6.6 Envasado.....	43
3. MATERIALES Y METODOS.....	44
3.1 Etapa 1: Extracción de muestras a partir de las pilas de fermentación.....	45
3.2 Etapa 2: Monitoreo de la fermentación de sotol a nivel artesanal.....	45
3.3 Etapa 3: Siembra de microorganismos, a partir de la cinética de fermentación del mosto de sotol.....	45
3.4 Etapa 4: Aislamiento de colonias de levaduras observadas macroscópicamente y microscópicamente.....	45
3.5 Etapa 5: Purificación de las levaduras aisladas.....	46
3.6 Etapa 6: Aplicación de pruebas Fisiológicas, (Pruebas bioquímicas de fermentación, asimilación de carbohidratos, asimilación de nitratos).....	46
3.6.1. Pruebas bioquímicas de fermentación.....	47

3.6.2 Asimilación de carbohidratos	47
3.6.3 Asimilación de nitrato	47
3.7 Etapa 7: Aplicación prueba de esporulación.....	47
3.8 Etapa 8: Realización de cinéticas de fermentación de las cepas de levaduras aisladas	48
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
4.1 Etapa 1: Extracción de muestras a partir de las pilas de fermentación.	49
4.2 Etapa 2: Monitoreo de la fermentación de sotol a nivel artesanal	49
4.3 Etapa 3: Siembra de microorganismos del mosto de sotol.....	50
4.4 Etapa 4: Aislamiento de colonias de levaduras observadas macroscópicamente y microscópicamente.....	51
4.5 Purificación de las levaduras aisladas	51
4.6 Etapa 6: Aplicación de pruebas fisiológicas (Pruebas bioquímicas de fermentación, asimilación de carbohidratos y asimilación de nitratos)	53
4.6.1 Pruebas bioquímicas de fermentación	53
4.6.2 Asimilación de carbohidratos	54
4.6.3 Prueba asimilación de nitratos	55
4.7 Etapa 7: Prueba de esporulación.	56
4.8 Etapa 8: Realización de cinéticas de fermentación en las cepas de levaduras aisladas	59
5. CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA CITADA	63
ANEXOS	65

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema Embden-Meyorhof (Sánchez 1961).....	13
Fig. 2 Diagrama de flujo de elaboración de Sotol.....	37
Fig. 3 Corte de la planta de sotol.....	38
Fig. 4 Acarreo de las cabezas de sotol	38
Fig. 5 Horno de piedra.....	39
Fig. 6 Chimenea	39
Fig. 7 Horno encendido.....	39
Fig. 8 Colocación de las cabezas de sotol.....	39
Fig. 9 Sotol cocido.....	39
Fig. 10 Majado.....	39
Fig. 11 Mortero lleno.....	39
Fig. 12 Pisoteo.....	40
Fig. 13 Monitoreo de temperatura.....	40
Fig. 14 Monitoreo de olor.....	40
Fig. 15 Llenado de la pila de fermentación.....	40
Fig. 16 Pisoteo del sotol.....	40
Fig. 17 Tanques en fermentación.....	41
Fig. 18 Tanque en fermentación.....	41
Fig. 19 Sotol fermentado para destilar	41
Fig. 20 Cazo.....	42
Fig. 21 Cabeza de moro.....	42
Fig. 22 Serpentín con refrigerante.....	42
Fig. 23 Horno del destilador	42
Fig. 24 Destilador	42
Fig. 25 Salida del destilado	42
Fig. 26 Graduación del destilado.....	42
Fig. 27 Almacenaje	43
Fig. 28 Graduación final.....	43
Fig. 29 Envasado de sotol	43
Fig. 30 Cinética de fermentación.....	50
Fig. 31 Colonias de levaduras en medio YPD.....	52
Fig. 32 Colonias de levaduras observadas en estereoscopio	52
Fig. 33 Morfología de la célula.....	52
Fig. 34 Colonias de levaduras en medio YPD.....	52
Fig. 35 Colonias de levaduras observadas en estereoscopio	52
Fig. 36 Morfología de la célula en cultivo puro.....	52
Fig. 37 Colonias de levaduras en medio YPD.....	53
Fig. 38 Colonias de levaduras observadas en estereoscopio	53
Fig. 39 Morfología de la célula en cultivo puro.....	53
Fig. 40 Formación de ascas	57
Fig. 41 Ascas triesporada	57
Fig. 42 Esporas germinando	57
Fig. 43 Formación de ascas	57
Fig. 44 Ascas triesporada	57

Fig. 45 Esporas germinando	57
Fig. 46 Formación de ascas	58
Fig. 47 Ascas triesporada	58
Fig. 48 Esporas germinando	58
Fig. 49 Cinética de fermentación levadura amarilla cepa 1	60
Fig. 50 Cinética de fermentación levadura cremosa cepa 2.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de las bebidas alcohólicas de acuerdo con el sustrato del procede	8
Tabla 2 Principales Congenéricos presentes normalmente en las bebidas alcohólicas	10
Tabla 3 Análisis del mosto	49
Tabla 4 Caracterización de colonias de levaduras	51
Tabla 5. Pruebas bioquímica de fermentación en soto.	53
Tabla 6 . Asimilación de carbohidratos	54
Tabla 7 Asimilación de nitratos	55
Tabla 8 Resultados de la levadura amarilla 1	59
Tabla 9 Resultados de levadura cremosa cepa 2	61

1 INTRODUCCIÓN

La elaboración de bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer con precisión el origen de esta práctica. Existen evidencias arqueológicas de más de 7000 años de antigüedad. Durante milenios el hombre supo fermentar mostos que contenían carbohidratos con técnicas muy depuradas, e incluso aprendió a destilar el alcohol para aumentar su concentración en las bebidas. Todo sin tener idea del papel ni de la existencia de los microorganismos, probablemente las primeras bebidas se hicieron a partir de sustratos azucarados como los jugos de frutas, ya que esto solamente requiere poner en contacto al jugo con la levadura silvestre presente en la superficie de la propia fruta (García *et al* 2004).

Muchos estudios se han realizado sobre las levaduras desde que Pasteur demostrara que estas eran las responsables de la transformación de los azúcares del mosto en etanol propia de las fermentaciones vinícolas. No obstante la fermentación alcohólica se trata de un proceso complejo y todavía dista bastante de estar completamente entendido. Lo que parece claro es que las fermentaciones alcohólicas realizadas espontáneamente no son debidas a la acción de una única especie ni de una única cepa de levadura, sino que es el resultado de la acción combinada de diversas especies de levaduras que crecen en mayor o menor cantidad (Ribéreau, *et al* 1975). El principal interés que se le debe dar es a las levaduras del género *Saccharomyces* que es la más apta para consumir todos los azúcares (Querol *et al* 1992).

El sotol es una bebida alcohólica destilada de carácter fuerte, dominante incluso sobre el tequila, con el cual se le puede comparar. Un sotol de calidad es un aperitivo digno de los paladares y gustos más exigentes. El sotol se produce desde tiempos remotos, los antiguos pobladores del desierto ya preparaban su aguardiente con la planta de sotol y desde entonces se sigue una tradición y cultura regular en la elaboración de esta bebida.

Los métodos tradicionales rudimentarios de producción de la bebida alcohólica son sencillos, baratos, no requieren equipo complicado y utilizan materia prima disponible. Se produce a nivel artesanal o a pequeña escala, en muchas ocasiones con malas condiciones higiénicas y se obtiene sotol de calidad variable.

Hasta ahora el sotol es lo que el tequila hace treinta años, una bebida vulgar de calidad dudosa y apta para quienes quieren emborracharse a muy bajo costo.

Los proyectistas de la bebida alcohólica sotol creen que este aguardiente tiene un potencial enorme, como lo es ahora con el tequila. Experiencias de empresas Chihuahuenses con esta bebida elaborada, con normas de calidad han derivado en premios internacionales y elevado el costo de la botella de un litro hasta 35 dólares en el consumidor final del mercado europeo. Pero para lograr un reconocimiento como productores de sotol se tienen que resolver muchas interrogantes, para empezar no todas las variedades de *Dasyliirion* se pueden emplear además, se necesita una muy bien cuidada destilación para quitar el espantoso tufo, ¿Cuánto tiempo se debe cocer la cabeza antes de extraer el jugo? ¿Cómo se debe fermentar?, ¿Conocer al microorganismo responsable de la fermentación alcohólica? ¿Cuántas destilaciones hay que hacer? ¿Cómo se debe almacenar?, si se le pueden agregar sabores artificiales o alcoholes neutros. En fin hay muchas preguntas que responder, para mejorar la elaboración a nivel rural y poder producir a nivel industrial y obtener un sotol de calidad.

1.1 JUSTIFICACIÓN

La realización del presente trabajo es a consecuencia en dar solución a uno de los tantos problemas que se presentan, en la elaboración de la bebida alcohólica sotol, de las zonas rurales.

La investigación relacionada con los alimentos fermentados tradicionales, trata de obtener productos de buena calidad, a nivel rural, para industrializarlos y expandir su distribución, para utilizarlos en el desarrollo de nuevos productos o para aprovechar las características especiales de su microbiota en otros procesos.

El uso de levaduras seleccionadas, hará fermentaciones controladas lo cual hace productos de elevada calidad, frente a otros métodos más tradicionales de fermentaciones sin control de los inóculos de levaduras, en donde se ve afectada por diferentes microorganismos.

Las levaduras seleccionadas evitan anomalías de la fermentación, como paradas espontáneas, alteraciones químicas y microbiológicas en las primeras fases de fermentación lo cual mejora e influye en la calidad, tanto gustativa como aromática de las bebidas alcohólicas.

Para asegurar la fermentación alcohólica en el sotol es necesario usar cultivos iniciadores, de Levaduras.

OBJETIVOS

GENERAL.

Aislar Identificar y Clasificar las levaduras de la fermentación alcohólica del sotol.

ESPECIFICOS:

Realizar análisis físico químico de las muestras de mosto de sotol

Aislar y conservar las levaduras a partir de las pilas o cubas de fermentación del sotol.

Identificar y clasificar las levaduras a partir de los tanques o cubas de fermentación del sotol.

Realizar cinéticas de fermentación con cada una de las levaduras aislad

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre bebidas destiladas

2.1.1 Antecedentes de la destilación

La destilación es una de las más tempranas manifestaciones de la tecnología química. El proceso ya se conocía en China muchos siglos antes del nacimiento de Cristo, y se cree que la primera bebida destilada se elaboró a partir de vino de arroz alrededor de 800 años a.c. El secreto de la destilación permaneció en China hasta los primeros años d.c. Los químicos árabes aprendieron el arte y fueron quienes diseñaron el primer destilador verdaderamente eficaz, el alembic. Un descendiente directo del alembic, el alambique post still, todavía se utiliza para la destilación de diversas bebidas espirituosas, incluido el whisky escocés (Varnam, 1994)

Los árabes introdujeron la destilación en Europa occidental a partir del norte de África. El nuevo arte interesó mucho a los alquimistas y a los monjes, quienes lo aplicaron a la elaboración de destilados.

Los alquimistas europeos creyeron que el destilado era un nuevo elemento agua de vida por lo que se consideró que los destilados poseían propiedades medicinales. El consumo de bebidas espirituosas se extendió durante las epidemias que azotaron Europa y, en 1506, el rey Jacobo IV de Escocia otorgó al gremio de los cirujanos barberos el permiso exclusivo para destilar el agua vital. Todavía hoy perdura la creencia en las propiedades medicinales de los destilados, en particular en las que se atribuyen al brandy y al whisky (Varnam, 1994).

En Parras de la Fuente Coahuila la bebida de sotol se le considera con propiedades medicinales para la diabetes.

2.1.2 Destilación

La destilación consiste en la separación de los componentes de una solución en función de su volatilidad en el punto de ebullición (punto de destilación). El material a destilar es una mezcla de agua, etanol y otros compuestos de diversas volatilidades (Varnam, 1994).

Cualquier aparato de destilación se compone, en principio, de un recipiente (caldera), en donde se lleva a la temperatura deseada el líquido que hay que destilar, y de un refrigerante, para enfriar o condensar los vapores. El producto de la destilación o flema, contiene algo más que el alcohol. Se ha visto, que el líquido alcohólico a destilar tiene una composición muy compleja, de manera que pasan en la destilación, no solamente alcohol, sino otros compuestos volátiles como son aldehídos, éteres, ácidos y alcoholes superiores,

Los cuerpos más volátiles que el alcohol ordinario y que son los primeros en pasar con un poco de alcohol al comienzo de la destilación constituyen los productos de cabeza o cabezas.

Los cuerpos cuyo punto de ebullición es muy próximo al del alcohol ordinario y que pasan aproximadamente al mismo tiempo que este en el medio de la destilación constituyen los productos llamados corazón o medios.

Los cuerpos cuyo punto de ebullición es superior al del alcohol ordinario y que pasan con un poco de alcohol ordinario al final de la destilación constituyen los productos de cola o colas.

Se detiene la destilación cuando el líquido que sale del refrigerante no contiene más alcohol, es decir cuando el alcoholímetro marca 0°. La rectificación tiene como objeto separar el alcohol puro o de buen gusto, de las impurezas que lo acompañan una vez, que se ha efectuado la destilación. Estas impurezas provienen de diversos orígenes como por ejemplo:

De las materias primas empleadas: sabemos, en efecto, que el gusto de las frutas (uvas, manzanas, cerezas, etc.), debido a aromas especiales, se encuentra el líquido alcohólico que proviene de su fermentación. Estas materias primas contienen igualmente ácidos. Una parte de estos ácidos, así como los cuerpos más o menos volátiles que forman estos aromas especiales, pasan a las flemas.

De la fermentación: Esta no solamente transforma el azúcar fermentable o glucosa en alcohol y ácido carbónico, sino que se forman al mismo tiempo, un gran número de productos entre los cuales figuran la glicerina, el ácido succínico y una serie de otros alcoholes (alcoholes propílico, butílico, amílico, glicólico, etc.) En el líquido que va a destilarse se encuentran igualmente aldehídos, éteres resultantes de la combinación de los ácidos con los alcoholes formados).

De la destilación: Durante la destilación y a consecuencia del calor se forman ciertos cuerpos, principalmente el furfurool.

La rectificación de los aguardientes brutos es muy simple se hace una segunda destilación suministrando calor muy lentamente, se elimina o separa lo que destila al principio (cabezas) y lo que se destila al final (colas), todo el arte del destilador de aguardientes consiste en la manera de conducir el calentamiento y efectuar la rectificación, incompleta, dejando en el aguardiente los productos que le perfuman con sus aromas particulares (Xandri, 1958).

2.1.3 Clasificación de las bebidas alcohólicas.

Una forma de clasificación de las bebidas, alcohólicas puede ser en función del sustrato del que procede, si son o no destiladas, o si son simples o compuestas. Los dos primeros criterios son empleados en la clasificación que se presenta en la tabla 1; además de las bebidas destiladas y no destiladas se hace una distinción intermedia: ésta es la de las bebidas fortificadas, cuyo grado alcohólico ha sido incrementado mediante la mezcla de una bebida alcohólica no destiladas con una destilada o con alcohol. El último criterio de clasificación se refiere a si la bebida consta exclusivamente del producto obtenido mediante la fermentación y, en su caso, la destilación (simples), o si además se le adicionaron algunos otros componentes que contribuyan al sabor (compuestas): tal es el caso de las infusiones como el lúpulo en la cerveza, el enebro y las cáscaras de naranja en la

ginebra, hierbas y especias en el vermouth, etc., o bien, la adición de jugos o extractos de frutas como en los licores de frutas o en los curados del pulque (García *et al* 2004).

Tabla 1 Clasificación de las bebidas alcohólicas de acuerdo con el sustrato del procede

Sustrato	No destiladas	Destiladas	Fortificadas
Frutas Uva	Vino, champaña Vinos espumosos	Brandy, Coñac Armañac, Pisco grappa	Jerez oporto Vermuth, madeira, moscatel
Manzana	Sidra, Sidra espumosa	Calvados	
Pera	Perry		
Cereza	Kirsch		
Otras	Vinos de frutas		
Cereales Cebada	Cerveza	Whisky	
Maíz	Tesgüino	Bourbon, whisky de maíz, whisky de Tennessee	
Varios (Incluyendo papa)		Vodka, ginebra akvavit	
Arroz	Sake		
Sorgo	Cerveza africana		
Caña Melazas O jugo		Ron, aguardiente cachaza, pinga, charanda	
Agaves	Pulque	Tequila, mezcal	
Miel	Vino de miel		

Los datos son tomados de García *et al* (2004)

2.1.4 Congenéricos.

El denominador común de todas las bebidas alcohólicas es que son productos con un contenido significativo de etanol obtenido mediante fermentación, donde generalmente predomina como microorganismo productor la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sabor y aroma de las bebidas alcohólicas esta influenciado en gran parte por ese alcohol; sin embargo, una gran variedad de

compuestos orgánicos presentes en cantidades mucho menores son también responsables de estos atributos y contribuyen grandemente a las características distintivas entre las diferentes bebidas alcohólicas. Estos compuestos son alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados, en conjunto reciben el nombre de congenéricos.

El origen de los congenéricos se encuentra principalmente en la cepa de la levadura y otros microorganismos presentes en el sustrato; estos producen algunos de los compuestos y transforman algunos otros en el sustrato. También la materia prima contribuye en la aportación de congenéricos, algunos de los cuales permanecen inalterables durante la fermentación. En general los factores que afectan la formación de congenéricos son: la cepa de levadura en gran medida, la temperatura de la fermentación la concentración de oxígeno en el medio, la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno el tipo y concentración de azúcares fermentables, la concentración y tipo de aminoácidos y la concentración de algunas vitaminas. Además las operaciones posteriores a la fermentación alcohólica afectarán significativamente las concentraciones y proporciones de los congenéricos, estas son: fermentaciones secundarias, destilación y añejamiento. Algunos productos como el vodka, quedan prácticamente libres de congenéricos debido a una destilación muy refinada, mientras que las bebidas no destiladas son ricas en estos compuestos.

Si bien la formación de estos es en general deseable, hay algunos que no lo son y su concentración debe ser lo más bajo posible. Dos ejemplos de estas situaciones son el metanol, proveniente de la propia levadura o de la desmetilación de las pectinas, alcohol de muy alta toxicidad, y el diacetilo, el cual confiere a la bebida un sabor desagradable. En la tabla 2 muestra los principales congenéricos normalmente presentes en las bebidas alcohólicas (García *et al* 2004).

Una de las desventajas que enfrenta el sotol es el aroma y resabio que queda al ingerirlo, el cual contiene un aroma a queso o a mantequilla, producidos por una levadura silvestre de la fermentación. La levadura *Saccharomyces ludwigii* es especial en la formación del nada agradable diacetilo.

Tabla 2 Principales Congenéricos presentes normalmente en las bebidas alcohólicas

Tipo de compuesto	Compuesto
Alcoholes pesados (aceite de fusel) C3 C4 C5	N-propanol Butanol, iso-butanol, sec-butanol Amílico, isoamílico, amílico activo
Otros alcoholes	Glicero, 2-feniletanol
Carbonilos (aldehídos y cetonas)	Acetaldehído, acetona, 2,3-pentanodiona
Ácidos orgánicos	Formica, acético, propiónico, Láctico, butírico
Ésteres	Acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de metilo

2.1.5 Denominación de origen

Algunas bebidas alcohólicas tienen denominación de origen, esto significa que ninguna bebida puede ostentar ese nombre particular si no fue producida dentro de la región específica de esa denominación, con la materia prima del lugar y bajo determinadas normas de proceso y calidad establecidas por las autoridades de los países correspondientes y aceptados en acuerdos internacionales por otros países. Algunas bebidas con denominación de origen son: Champaña, Coñac. Tequila, Bourbon Jerez, etcétera (García *et al* 2004).

En el año 2004 el sotol adquiere su denominación de origen expedida por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial en la cual señala lo siguiente: El Sotol es la bebida alcohólica que se obtiene de las plantas conocidas comúnmente como sotol o sereque, obtenidas de poblaciones naturales y cultivadas en los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango.

2.2. Fermentación

2.2.1 Definición

La raíz de la palabra fermentación significa un estado de burbujeo suave. Este término se aplicó por primera vez a la producción de vino hace más de mil años. La acción burbujeante era debida a la conversión del azúcar en dióxido de carbono.

2.2.2 Antecedentes de la fermentación

Las bebidas fermentadas ya se conocían en la antigüedad en Grecia e Italia era el vino la más importante de todas las bebidas fermentadas. En Egipto y Mesopotamia, la cerveza había alcanzado una difusión más amplia que el vino. Entre los Germanos, y en ciertas partes del norte de Europa, ya se fabricaba cerveza varios siglos antes de nuestra era. Las bebidas fermentadas de la antigüedad se obtuvieron, probablemente, mediante fermentación espontánea: se deduce de los escritos del historiador danés Saxo (Jørgensen, 1959).

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos. Existe una gran variedad de este tipo de alimentos en el mundo. Algunos de ellos como la cerveza, el vino, el vinagre, los quesos y el pan han sido extensamente estudiados, se han aislado los microorganismos que producen los cambios deseados en sus materias primas. Existen, sin embargo, un gran número de alimentos fermentados que se producen en forma regional y que no se conocen fuera de su lugar de origen. Estos alimentos forman parte importante de su dieta de muchos grupos étnicos, los cuales los han consumido desde tiempos inmemoriales (García *et al* 2004).

2.2.3 Fermentación alcohólica

A la fermentación alcohólica se le puede llamar también fermentación anoxidativa debido a que el oxígeno no interviene como aceptor sino otras sustancias en especial los aldehídos (Jørgensen, 1959).

La fermentación alcohólica consiste fundamentalmente en la conversión de azúcar a etanol y CO₂ a consecuencia del desarrollo de microorganismos, principalmente del grupo de las levaduras, que al efectuar su crecimiento en condiciones de anaerobiosis, transforman los sustratos glúcidos, particularmente glucosa, produciendo alcohol en proporción adecuada para su aprovechamiento industrial. Estos organismos determinan dichas transformaciones por acción enzimática. (Sánchez, 1961)

La forma como se efectúa la fermentación de la glucosa ha sido interpretada de varias maneras. Una de ellas es la explicación de Gay-Lussac, quien estableció por primera vez la fórmula general de la fermentación alcohólica en los términos siguientes:



La producción de etanol, el principal producto de la fermentación, conlleva la formación en aerobiosis de piruvato a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof Fig. 1 y la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para rendir acetaldehído. Finalmente el acetaldehído se reduce a etanol.

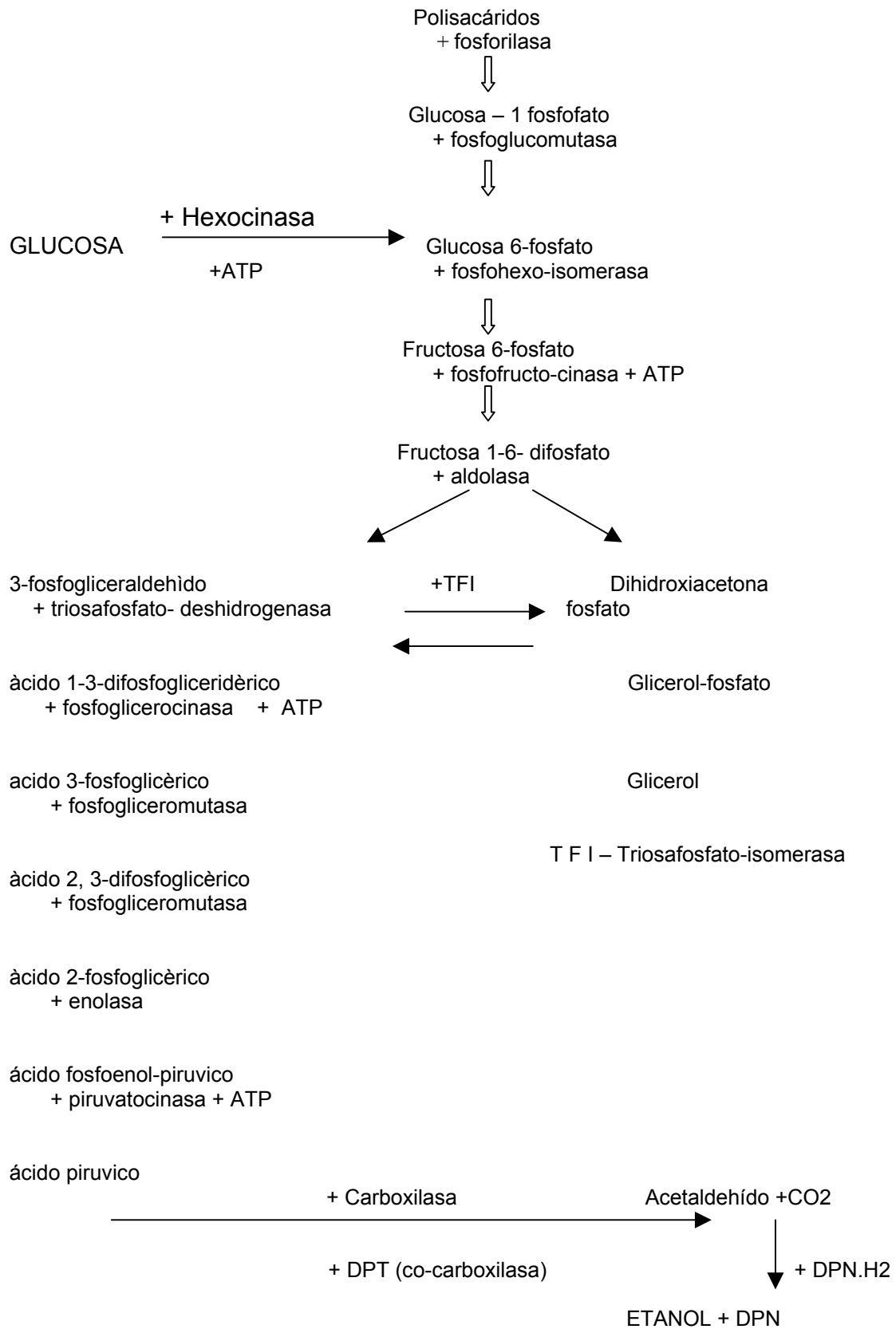


Fig. 1 Esquema Embden-Meyorhof (Sánchez 1961)

2.2.4 Carbohidratos fermentables por las levaduras

Los hidratos de carbono que se pueden fermentar, por lo general son aquellos que contienen tres átomos de carbono o un múltiplo de los mismos. Los monosacáridos se pueden fermentar directamente, mientras que los di, tri y polisacáridos tiene que ser hidrolizados a hexosas antes de ser fermentados.

Se conocen cuatro hexosas fermentables, a saber: glucosa, fructosa, manosa y lactosa. Las tres primeras siempre son fermentables, mientras que la última sólo puede ser fermentada por ciertas especies de levaduras.

Como se ha dicho arriba, los disacáridos sólo se pueden fermentar después de haber sido transformados en hexosas, transformación que se realiza por intermedio de hidrolasas que se encuentran en la lavadura. Por lo tanto, el que un disacárido pueda ser fermentado depende en primera instancia de que la especie correspondiente de la levadura sea capaz de producir la enzima necesaria para la hidrólisis.

De los polisacáridos, el glucógeno puede ser fermentado en algunos casos por la levadura, a veces también la dextrina, pero casi nunca el almidón. (Jôrgensen, 1959).

2.2.5 Factores que afectan la fermentación

2.2.5.1 Temperatura

Las levaduras son microorganismos mesófilos, esto hace que la fermentación pueda tener lugar en un rango de temperaturas desde los 13-14°C hasta los 33-35°C. Dentro de este intervalo, cuanto mayor sea la temperatura mayor será la velocidad del proceso fermentativo siendo también mayor la proporción de productos secundarios. Sin embargo, a menor temperatura es más fácil conseguir un mayor grado alcohólico, ya que

parece que las altas temperaturas que hacen fermentar más rápido a las levaduras llegan a agotarlas antes. La temperatura más adecuada para realizar la fermentación alcohólica se sitúa entre los 18-23°C y es la que se emplea generalmente en la elaboración de vinos, Por encima de 33-35°C el riesgo de parada de fermentación es muy elevado, al igual que el de alteración bacteriana ya que a estas elevadas temperaturas las membranas celulares de las levaduras dejan de ser tan selectivas, emitiendo substratos muy adecuados para las bacterias (Jørgensen, 1959)

2.2.5.2 Aireación

Durante mucho tiempo se pensó que las levaduras eran microorganismos anaerobios estrictos, es decir, debía realizarse la fermentación en ausencia de oxígeno. Sin embargo, es un hecho erróneo ya que requieren una cierta aireación. Una aireación sumamente excesiva es totalmente absurda ya que, entre otras consecuencias no obtendríamos alcohol sino agua y anhídrido carbónico debido a que las levaduras, cuando viven en condiciones aeróbicas, no utilizan los azúcares por vía fermentativa sino oxidativa, para obtener con ello mucha más energía.

2.2.4.3 pH

El crecimiento y la fermentación de la levadura dependen en alto grado de la reacción del medio nutritivo. El pH óptimo para el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* es entre 4,4 – 4,8. En las alcoholeras se trabaja a un pH alrededor de 4,2 para evitar contaminaciones en el medio de microorganismos indeseables (Carpenter, 1969)

2.2.5.4 Nutrientes activadores

Las levaduras fermentativas necesitan los azúcares para su catabolismo, es decir para obtener la energía necesaria para sus procesos vitales, pero

además necesitan otros substratos para su anabolismo como son nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, magnesio, calcio y vitaminas, especialmente tiamina (vitamina B1). Por ello es de vital importancia que el medio disponga de una base nutricional adecuada para poder llevar a cabo la fermentación alcohólica.

El nitrógeno es de todos el más importante, siendo necesario que el mosto contenga inicialmente nitrógeno amoniacal y en forma de aminoácidos por encima de 130-150 ppm. Una deficiencia de estos nutrientes hará que "no les quede mas remedio" que atacar a las proteínas, liberándose H₂S (aroma a huevos podridos). (Collado 2001)

La presencia de esteroides y ácidos grasos insaturados es también necesaria obteniéndolos inicialmente del mosto y posteriormente de las células madres. Esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga son necesarios fundamentalmente para que sus membranas celulares puedan ser funcionales (Collado 2001)

2.2.5.5 Inhibidores

Es importante evitar la presencia de inhibidores en el mosto como restos de productos fitosanitarios y ácidos grasos saturados de cadena corta.

2.2.5.6 Concentración inicial de azúcares

No se debe fermentar un mosto con una concentración muy elevada de azúcares. En estas condiciones osmófilas las levaduras simplemente estallarían al salir bruscamente el agua de su interior para equilibrar las concentraciones de solutos en el exterior y en el interior de la célula, es decir, lo que se conoce como una plasmólisis (Collado, 2001).

2.3 Fermentación espontánea

La fermentación alcohólica en los mostos, es una compleja reacción bioquímica en la que intervienen distintos tipos de microorganismos que interaccionan entre sí dando lugar a un fascinante modelo de estudio de dinámicas poblacionales. Dejando al margen el evidente interés teórico de este tipo de estudios, y centrándonos en el proceso tecnológico, hay que resaltar que, a pesar de que es posible aislar distintas especies bacterianas, fúngicas y levaduriformes a lo largo del proceso, son estas últimas las ejecutoras de la fermentación alcohólica y por ello las responsables de la producción del etanol.

Las fermentaciones espontáneas son aquéllas que se producen de forma natural, es decir, las realizan las levaduras provenientes de la materia prima y del material de proceso sin ningún tipo de inoculación externa. Esto hace que las fermentaciones espontáneas no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación (Gayon *et al.*, 1975)

2.3.1 Importancia del aislamiento

La microbiota levaduriforme presente en un mosto puede verse alterada por numerosos factores que dan lugar a cambios tanto cuantitativos como cualitativos. condiciones climatológicas el uso de fungicidas en el medio, la concentración de azúcares del sustrato o los procesos sin control. En cualquier caso, las diferencias en las especies levaduriformes presentes, en su porcentaje, conllevan cambios drásticos en el proceso fermentativo que se reflejan en una gran variación de las características organolépticas y la calidad de las bebidas alcohólicas.

Para solventar este problema, desde hace años se viene utilizando en distintas regiones enológicas la adición de cultivos puros de *S. Cerevisiae* que se inoculan al mosto en una concentración determinada (Bureau, 1982) El resultado de estas prácticas es la obtención de productos que tiene una calidad basal repetitiva con tiempos más cortos de fermentación. La inoculación del mosto produce un inicio

rápido de la fermentación alcohólica y reduce el desarrollo de las levaduras no *Saccharomyces*.

En las fermentaciones inoculadas la levadura inoculada se impone, y lo hace a unas concentraciones poblacionales tales que, al final de la fermentación, es el principal microorganismo. No hay un cultivo puro, pero sí uno mayoritario. (Querol, *et al* 1992).

2.3.2 La identificación de las levaduras

Al comenzar la Edad Media -no se sabe con exactitud cuándo- se aprendió que la sustancia que origina la fermentación se debe buscar en el sedimento que se reúne al final del proceso en la cuba de fermentación, e instintivamente se transmitieron desde la antigüedad las formas de usar estas sustancias. En nuestros tiempos la identificación de levaduras juegan un papel primordial para el técnico en fermentaciones en parte en la comprobación de especies de levaduras silvestres en la levadura cultivada, o para la diferenciación de especie y tipos de levadura (Jørgensen, 1959).

Tradicionalmente, los métodos utilizados para la identificación y caracterización de especies y cepas de levadura se han basado en sus características morfológicas, sexuales y bioquímicas (Kreger-Van Rij, 1984), Como características de morfología : Características de reproducción, características de células vegetativas. Características culturales: Crecimiento en medio líquido, crecimiento en medio sólido. Características sexuales: características de las ascas y ascosporas Características Fisiológicas: fermentación de compuestos carbonados asimilación de compuestos carbonados asimilación del nitrógeno. Pero estas están muy influenciadas por las condiciones del cultivo y pueden dar resultados poco precisos. La forma de las células, la apariencia de los cultivos en medios sólidos y líquidos, la tolerancia a diferentes condiciones de cultivo y la posibilidad de asimilar o fermentar diferentes sustratos (Lodder 1970). Estas metodologías siguen siendo muy valiosas y ampliamente utilizadas por los taxónomos, son a menudo insuficientes para establecer con precisión la filogenia de las levaduras.

La biología molecular ha dado al taxonomista potentes herramientas para establecer con mucha precisión la clasificación de las levaduras. Y a desarrollado técnicas que se presentan como una alternativa a los métodos tradicionales para la caracterización e identificación de levaduras. A continuación se citan algunos de los métodos de identificación de levaduras.

2.3.2.1 Métodos de identificación de las levaduras

2.3.2.2 Análisis de proteínas

El análisis de las proteínas de la levadura es un método mucho más sencillo que los métodos de identificación basados en la extracción del ADN.ribosomal mediante PCR (reaccion en cadena de la polimerasa) (Guillamón *et al.*, 1998)

2.3.2.3 Cromatografía de gases

Aunque se trate de una técnica complicada, el cromatógrafo de gases ya se ha convertido en un instrumento relativamente habitual en los laboratorios de enología. Por eso, los intentos de caracterizar cepas de levaduras por su perfil de ácidos grasos prometen ser muy interesantes, aunque la estandarización de los medios de cultivo y otros parámetros son críticos a la hora de asegurar la fiabilidad de los resultados.(Querol A., Barrio E., Ramón D. 1992).

2.3.2.4. Rapd

Esta RAPD (siglas que corresponden a Random Amplified Polymorphic DNA),o ADN polimòrfico de amplificación aleatoria es una técnica de análisis del DNA genòmico por medio de PCR usando cebadores aleatorios.(Quesada, 1995)

2.3.2.5 Análisis genómico

Querol et al, (1992) Han desarrollado un método de análisis del DNA mitocondrial (mtDNA). Esta técnica es rápida permite el análisis de un mayor número de cepas en menos tiempo, y su aplicación resulta ideal en la industria por su rapidez, seguridad y economía, y por no requerir material sofisticado ni personal muy especializado

2.3.2.6 La esporogénesis como característica de especie

Hansen (1893) demostró, por medio de sus primeras investigaciones sobre los sacaromicetes, que la endosporogénesis puede servir como característica de especie de estos microorganismos. (Jôrgensen, 1959).

La esporulación en la levaduras es importante por tres razones: constituye la base de un método de reproducción, desempeña una función en la producción de nuevos híbridos y sirve para mantener la vialidad de las especies durante los cambios adversos del medio ambiente (Prescott, 1962).

2.4 Usos de las levaduras

Las levaduras tienen un papel importante en nuestros días ya que las diferentes especies y variedades se les han estado dando usos en las industrias como continuación se mencionan, por nombrar algunas

Saccharomyces cerevisiae: Esta levadura ha sido utilizada en la elaboración de vino, sake, cerveza y, hoy en día, para la producción industrial de alcohol. como probiotico contra E.coli en cerdos. probióticos en humanos contra la enfermedad de Crohn, y como Suplemento alimenticio en el crecimiento de rumiantes.

Saccharomyces carlsbergensis: Se utiliza en la producción de cerveza lager

Saccharomyces rouxii: En la elaboración de la salsa de soya, la cual se obtiene utilizando a esta levadura

Kluyveromyces fragilis: Es una especie fermentadora de la lactosa que se explota en pequeña escala para la producción de alcohol a partir del suero de la leche.

Yarrowia lipolytica: Es una fuente industrial de ácido cítrico.

Candida utilis: Se emplea en la industria alimentaría, puede crecer metabolizando azúcares de cinco átomos de carbono (pentosas).

Phaffia rhodozyma: Produce un pigmento especial llamado astaxantina. Esta molécula está siendo probada para añadirla en forma complementaria al alimento de las truchas y salmones de criadero.

Trichosporum cutaneum: Desempeña un importante papel en los sistemas de digestión aeróbica de aguas residuales debido a su enorme capacidad de oxidación de compuestos orgánicos, como los derivados fenólicos.

Saccharomyces Boulardii: Se usa con fines profilácticos y terapéuticos, por su capacidad inmunomoduladora, en humanos esta levadura ha sido usada contra el acné.

Saccharomycopsis lipolytica: Puede romper cadenas lineales de hidrocarburos de 10 a 16 átomos de carbono; existe una instalación piloto que ha logrado hacer crecer esta levadura con buenos resultados en presencia de una fracción purificada de petróleo, el cual, como se sabe, es un hidrocarburo. Esta levadura, al crecer, produce ácido cítrico como producto de desecho, el que a su vez es utilizado en otra serie de procesos industriales.

2.5 Las levaduras

La palabra levadura está ligada en la mayoría de los idiomas a un fenómeno externo del proceso fermentativo. La palabra alemana Heffen, señala el fenómeno de que se levanta un líquido en fermentación. La palabra francesa para la levadura, leveru, que se deriva de levar = levantarse. La palabra inglesa yeast (holandés gist) significa espuma y, por tanto, indica a otro fenómeno externo de la fermentación.

Meyen propuso en 1938 el nombre de *Saccharomyces* como nombre genérico para las levaduras (Jørgensen, 1959).

Las levaduras y organismos afines pertenecen a la subdivisión de las talofitas, designada como Eumycetos u hongos verdaderos, porque no poseen clorofila. El conjunto de las levaduras se distribuye en tres familias denominadas *Saccharomycetaceae*, *Sporobolomycetaceae* y *Cryptococcaceae*. Representa un grupo de microorganismos bastante mal definidos, situado entre las bacterias y los hongos superiores, en lo que respecta al tamaño promedio de la célula aislada. (Prescott, 1962).

2.5.1 Morfología de las células

Las levaduras son, por lo general. Organismos monoseculares, y se presentan en formas muy variadas desde esféricas, ovoides y elipsoidales, a las cilíndricas, que pueden ser muy alargadas y aun filamentosas. Estas formas, aunque diversas según las especies, son lo bastante características para ser base de clasificación. (Pelczar *et al* 1965).

2.5.2 Forma de reproducción

Las levaduras se reproducen vegetativamente por gemación o por fisión, y sexualmente por producción de esporas. La célula que contiene las esporas sexuales y protoplasma se denomina asca, y las esporas contenidas en el asca, ascosporas. En algunas especies que son normalmente monoselulares, después de la gemación permanecen unidas gran número de células, formando un pseudomicelio. En otros casos se forman verdaderos micelios por fisión (Phaff *et al*, 1978). El proceso de la reproducción sexual, en todas las levaduras verdaderas producen ascosporas. Por lo cual pertenecen al grupo de los Ascomycetos. El asca contiene, por lo general, de una a cuatro esporas, pero a veces su número es de ocho o más. Las esporas se reproducen por divisiones sucesivas del núcleo; cada núcleo así formado se rodea de material citoplásmico, y después, por la pared celular

2.5.2.1 Levaduras esporógenas

Este orden, *Endomycetales*, y se clasifican dentro con los Ascomicetos. es caracterizado por un cigoto o una única célula la cual puede ser transformada en un asca, bien directamente o después de formación precedente de células diploides. En las familias de las levaduras *Endomycetaceas* se encuentran micelios (aunque muy rara vez), Pseudomicelios oidios (artrosporos) y células en germinación (blastosporos). Con frecuencia, hay un estadio de multiplicación vegetativa entre la oxidativa como la fermentativa. Las levaduras que forman más cantidad de alcohol se encuentra entre las especies esporógenas (Phaff *et al*,1978).

Este orden *Endomycetales* es caracterizado por un cigoto o una única célula puede ser transformada en un asca, bien directamente o después de formación precedente de células diploides. En las familias de las levaduras *Endomycetaceas* se encuentran micelios (aunque muy rara vez), Pseudomicelios oidios (artrosporos) y células en germinación (blastosporos). Con frecuencia, hay un estadio de multiplicación vegetativa entre la oxidativa como la fermentativa. Las levaduras que forman más cantidad de alcohol se encuentra entre las especies esporógenas (Phaff, *et al* 1978).

2.5.3 Composición química de las levaduras

La levadura contiene un 75% de agua y un 25% de sustancia seca, aproximadamente. La sustancia seca de levadura tiene la siguiente composición aproximada: Ceniza 8%, Carbohidratos 43%, Proteína 48%, Grasa 2%. Las sustancias minerales de la levadura representa por lo general 5-9% del peso seco de los cuales son: K_2O , Na_2O , CaO , MgO , Fe_2O_3 , P_2O_3 , SO_3 y SiO_2 . Los hidratos de carbono se hallan presente en la levadura como hemicelulosas y goma de levadura en la pared celular, en parte como glucógeno y con pequeñas cantidades de diversos glúcidos en el citoplasma. El glucógeno, se encuentra en cantidades muy diversas, según los estadios vitales de la levadura.

Las sustancias nitrogenadas de la levadura corresponden unas dos terceras partes de su peso seco (30-75% contiene 5-12% N). La cantidad depende de la alimentación de la levadura, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura de cultivo. El contenido normal en grasa de la levadura es relativamente escaso de 1 a 7% de la sustancia seca. Siendo mínimo en las células en crecimiento y máximo en las células viejas. Las vitaminas de la levadura pertenecen al complejo vitamínico B. Las vitaminas de este complejo son idénticas a varias enzimas fermentativas o, de otra forma juegan un papel en los procesos catabólicos de la levadura. También algunos prebióticos de la levadura son de carácter vitamínico (Phaff, *et al* 1978). A si mismo se han aislado incierto numero de pigmentos en la levadura se ha ido aislando en cierto número de pigmentos, particularmente en las especies de *Rhodotorula* y *Cryptococcus*, dos géneros asporogenos (Prescott, 1962).

2.5.4 Enzimas de la levadura

Winge y Laustsen demostraron en 1939 que las enzimas de la levadura se hallan controladas por los genes (Jørgensen, 1959). Lo cual indica que cada levadura tiene propiedades diferentes para desdoblar a los sustratos.

En las levaduras se encuentran muchas hidrolasas, y algunas desmolasas. De las hidrolasas más importantes son:

Invertasa (sacarasa, β -h-fructosidasa), que escinde la sacarosa en fructosa más glucosa, se encuentra en la mayoría de las especies de levaduras esporogenas. La invertasa puede desdoblar la rafinosa en fructosa y melibiosa.

Maltasa (α -glucosidasa), que degrada la molécula de maltosa en dos moléculas de glucosa se encuentra en muchas especies de levaduras, pero falta en algunas, como por ejemplo en *Saccharomyces ludwigii*.

La lactasa (β -galactosidasa), que desdobla la lactosa en glucosa y galactosa, solo se encuentra en pocas especies de levaduras, como por ejemplo en *Saccharomyces Fragilis*.

La trehalasa degrada la trehalosa en moléculas de glucosa y se encuentra en muchas levaduras.

La melibiasa (α -galactosidasa) se separa de la melibiosa en glucosa y galactosa y, por lo general se encuentra en la levadura baja de cervecería, mientras que en muchas veces falta en la levadura de fermentación alta.

La glucogenasa, que degrada el glucógeno a glucosa. Además de las carbohidrasas ya mencionadas, las levaduras contienen numerosas proteinasas, que, entre otras funciones, intervienen en el proceso fermentativo, pero participando ante todo, en la asimilación. Las proteasas juegan un papel importante en el proceso de autodigestión en las levaduras, llamado autólisis (Jørgensen, 1959).

2.5.5 Asimilación de nutrientes en las levaduras

2.5.5.1 Definición

Bajo asimilación (*assimulo*, lat. = hacer semejante) se entiende un proceso, en el cual los microorganismos incorporan sustancias alimenticias y transforman las mismas en compuestos que se pueden utilizar en el trabajo plástico del organismo. Por ello, la asimilación es un proceso creador, en el cual se consume energía (Jørgensen, 1959).

2.5.5.2 Asimilación Nitrógeno

El nitrógeno se puede suministrar a las levaduras, dependiendo de la especie o raza, en forma de amoníaco, sales amónicas (tales como sulfato y fosfato diamónico), aminoácidos, péptidos, peptonas, urea o nitratos. Solo relativamente pocas especies de levadura son capaces de asimilar el nitrógeno de los nitratos. Las especies del género *Hansenula*, muestran generalmente esta capacidad. La

levadura de cerveza no puede utilizar ningún nitrógeno de nitrato, y en grandes cantidades los nitratos son tóxicos para la levadura cervecera (Jørgensen, 1959). Los ácidos aspártico y glutámico, la leucina, aspargina, glicocola y tirosina son buena fuente de nitrógeno para las levaduras. Según Nielsen (1937). El 99% del nitrógeno del ácido aspártico, aspargina y glicocola se asimila por las levaduras (Prescott, 1962). Solo una parte de , el 30-35 %, de nitrógeno del mosto puede ser asimilado por la levadura, es decir , aminoácidos, amidas y péptidos de escaso peso molecular. El límite parece encontrarse en los de 5 y 6 átomos de carbono por molécula.

2.5.5.3 Asimilación de Carbono

Los glúcidos juegan un papel primordial en la alimentación de las levaduras. Louis Pasteur halló en investigaciones con sacarosa que la levadura absorbe un 1% aproximadamente del azúcar en líquido fermentativo, para la plasticidad de sus células, es decir, que no todo el azúcar en líquido fermentativo se transforma en anhídrido carbónico y alcohol. La cantidad incorporada de azúcar y, por tanto, el aumento de las células dependen de la cantidad y tipo de las combinaciones nitrogenadas presentes y del acceso de oxígeno. Una parte del azúcar incorporado se almacena como sustancia de reserva en forma de glucógeno y otros polímeros de azúcares no reductores (Jørgensen, 1959)

Al considerar los azúcares como fuentes de carbono hay que recordar la diferencia que puede existir entre la capacidad de una levadura para asimilar un azúcar y su capacidad para fermentar el mismo azúcar. Del mismo modo, la capacidad para asimilar un compuesto determinado varía con las diferentes clases de levadura (Prescott, 1962).

2.5.6 Desasimilación en las levaduras

La desasimilación de las levaduras puede ser tanto oxidativa (respiración) como anoxidativa (fermentación). En ambos procesos se forma anhídrido carbónico.

Así, las levaduras no sólo tiene la habilidad de producir fermentación, si no que también son capaces de transformar azúcar en anhídrido carbónico y agua en presencia de oxígeno. Pero en la mayoría de las levaduras esporógenas, sobre todo en *Saccharomyces*, es en la fermentación la forma catabólica que predomina. (Jørgensen, 1959)

2.6 Factores que afectan a las levaduras

La actividad vital de las levaduras se ve influida por factores externos. Los más importantes de estos factores son los siguientes:

2.6.1 Agua

Las levaduras necesitan un poco más de agua que los mohos, pero menos que las bacterias. Conviene insistir, que entre las levaduras hay gran variación; algunas especies crecen en medios que contienen 40 % de agua. Y algunas pueden durante algún tiempo tolerar cierta desecación.

2.6.2 Oxígeno

Las levaduras fueron los primeros microorganismos en que se encontró crecimiento en un medio sin oxígeno atmosférico. En las levaduras la utilización anaerobia de azúcar genera principalmente alcohol y dióxido de carbono, en tanto que los productos aerobios son dióxido de carbono y agua. La multiplicación de las levaduras es mas rápida y en mayor cantidad en condiciones aerobias que anaerobias, el oxígeno se excluye cuando se desea producir alcohol.

2.6.3 Temperatura

La temperatura es importante para las funciones de la levadura como por ejemplo para la reproducción, formación de película y producción de esporas de las células vegetativas. La temperatura determina además la actividad de las distintas enzimas de las levaduras, y también en este aspecto las diversas especies reaccionan de forma diferente. La temperatura mas adecuada suele situarse entre

20 y 30 °C. La incubación suele satisfactoria. se obtiene grandes cantidades de células o bien de alcohol etílico. Las esporas de levadura resisten temperaturas bajas; sobreviven a los factores climáticos de invierno, y la congelación en la tierra. (Carpenter, 1969)

2.6.4 Luz

En la levadura los procesos reproductores no son influidos por la iluminación débil, pero sufren una inhibición por medio de la luz diurna difusa. En la luz diurna o la luz eléctrica, las células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces ludwigi* sólo se multiplican a la mitad de intensidad que en la oscuridad.

2.6.5 pH

Las levaduras crecen en límites amplios de pH, aunque sus requerimientos son más limitados que los mohos. muchas especies se multiplican en soluciones con acidez de pH 3 y alcalinidad de pH 7.5. La reacción óptima suele localizarse entre pH 4.5 y 5.0. El crecimiento y la fermentación de la levadura depende en alto grado de la reacción del medio nutritivo. Hjort- Hansen (1879) al cultivar levaduras a diferentes pH hallaron que el pH óptimo para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces elipsoideus* se encontraba entre 4.4- 4.8 (Jørgensen, 1959).

2.6.6 Potencial de oxido- reducción

El margen vital de las levaduras se extiende por lo general desde rH 10 hasta rH 27,5. La mayoría de los *sacaromicetes* prefieren cifras rH alrededor de 20. Sin embargo las levaduras pueden acostumbrarse a vivir en un potencial bajo de oxido reducción. Esto sucede, cuando se someten las levaduras al ácido sulfuroso en el mosto cuando se sulfita (Jørgensen, 1959).

2.6.7 Tóxicos

Según las investigaciones realizadas por White y Munns (1951) para las levaduras resultan muy tóxicas las siguientes sustancias cadmio, cobre, plata, osmio, mercurio y paladio. El cadmio y el cobre ejercen casi la misma acción tóxica; la plata tiene la mitad de toxicidad que el cadmio, y la toxicidad del mercurio es solo 1/ 10. El cobre impide por completo el crecimiento de levadura cuando se encuentra en un sustrato nutritivo sintético en la cantidad de 1 mg. por litro, pero en el mosto o en solución de melaza; las levaduras pueden tolerar 30-40 mg por litro de sustrato. Este aumento de la capacidad de resistencia probablemente se deba a que en el mosto y en la solución de melaza el cobre forma complejas combinaciones cúpricas. Tiene un bajo contenido tóxico el hierro, zinc, aluminio, plomo, molibdeno y manganeso. Los halógenos yodo, bromo y cloro son poco tóxicos cuando se encuentran en forma de sales alcalinas, pero en combinaciones orgánicas pueden ser venenosos.

2.6.8 Nitratos

Los nitratos a concentraciones muy elevadas de 25 mg por litro producen una acción tóxica sobre la levadura, comienza a hacerse notable y cuando se encuentra presente 50 mg por litro la acción tóxica es muy clara.

2.7 Levaduras industriales de la fermentación alcohólica

Las levaduras industriales han sido divididas desde el punto de vista práctico en dos grupos: levaduras superficiales y levaduras de fondo. Las primeras se extiende uniformemente en el mosto, no sedimentan; producen abundante gas desde el principio; su coeficiente respiratorio es menor de 77%; no producen gas a expensas de la melibiosa; son de fermentación alta; fermentan solamente un tercio de la rafinosa, son ricas en fósforo y magnesio, y aparecen generalmente en mostos ricos en glúcidos. La especie representativa es *Saccharomyces cerevisiae*. Las segundas sedimentan siempre en el fondo, es decir, no se desarrollan en la superficie; son de fermentación baja; su coeficiente respiratorio es mayor de 77%; producen gas a expensas de la melibiosa; fermentan la

rafinosa completamente; tienen calcio en abundancia y crecen especialmente en mostos ricos en prótidos. La especie representativa es *Saccharomyces carlsbergensis* (Sánchez, 1961)

2.7.1 Levaduras apiculadas

Estas levaduras son importantes en la industria porque contribuyen a la producción de sabores indeseables en los productos fermentados. Se les designa ese nombre por presentar aspecto o forma de limón y son comunes en las uvas y en los mostos pues crecen más rápidamente que las *Saccharomyces*, por lo cual abundan al principio de la fermentación, pero después desaparecen (Sánchez, 1961).

2.7.2 Levaduras que forman película

Estas levaduras son principalmente de tipo oxidativo, pues producen poco alcohol y gran cantidad de ésteres y se les puede dividir en dos grupos: a) levaduras ascospógenas, con los géneros: *Hansenula*, *Pichia* y *Debaryomyces* y b) levaduras anascospógenas del género *Candida*, como *Candida mycoderma*. (Sánchez, 1961).

2.8 Propiedades tecnológicas de las levaduras

2.8.1 Tolerancia al etanol

La mayoría de las cepas de *Saccharomyces* que se utilizan industrialmente poseen una tolerancia al etanol superior a las de sus homologas salvajes. Es indispensable que presenten una alta tolerancia al etanol para asegurar que la fermentación continúe hasta el contenido deseado de etanol, lo cual es de especial interés en las bebidas fuertes. La tolerancia al etanol está controlada por genes poligénicos e implica a varios mecanismos de los cuales se consideran que los más importantes son la tolerancia a la inhibición de los enzimas de la glicólisis por el producto final y la resistencia a sufrir daños o modificaciones en la membrana (Varnam, 1994). Las levaduras que se empleen en la obtención de

alcohol deben poseer características uniformes, estables y ser capaces de tolerar altas concentraciones de alcohol (Sánchez, 1961).

2.8.2 Floculación

Carácter floculante en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* constituye una propiedad tecnológica sobre su capacidad de formar flóculos, es de gran interés, especialmente en la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional, ya que la capacidad que manifiestan las células de levadura para agregarse espontáneamente, permite una rápida sedimentación de las mismas en el medio. Esto conlleva a facilitar las operaciones de removido y degüelle, pudiendo reducir los costes de producción en este tipo de vinificación particular (Suzzi *et al*, 1997).

La floculación consiste en la formación de una aglomeración abierta de células, por lo que no se diferencia de otras agregaciones como las masas en crecimiento o las formaciones en cadena. Esta en propiedad se requiere para conseguir una fácil separación de las levaduras del medio al final de la fermentación y para hacer mínima la aparición de sabores extraños debidos a un excesivo periodo de incubación. Sin embargo, una floculación precoz puede impedir que la fermentación se complete. La floculación no depende de la división celular y esta ligada a la presencia de iones divalentes, generalmente de iones de calcio que establecen puentes entre los grupos aniónicos de la superficie de las células. La capacidad para flocular viene determinada genéticamente, pero también influye el ambiente en contacto de la pared celular de la levadura. El fenómeno de la floculación viene afectado por diversos factores, pero en general se puede afirmar que los azúcares lo inhiben mientras que las sales lo favorecen (Varnam, 1994).

2.8.3 Resistencia a las toxinas

Algunas cepas de *Saccharomyces* producen una serie de toxinas extracelulares, las zimocinas, que son letales para otras cepas sensibles. La presencia de cepas productoras de toxinas pueden abortar las fermentaciones, por lo que la resistencia a estas toxinas es una característica deseada para cualquier cepa de *Saccharomyces* de uso comercial (Varnam, 1994)

2.9 Generalidades sobre sotol

2.9.1 Descripción botánica

Reino.....*plantae*
Phillium.....Magnoliopsida
Clase:.....*Liliopsida*
Sub-clase:.....*liliade*
Orden.....*Lilial*
Familia.....*Nolinaceae*
Genero.....*Dasyliirión*
Especie.....*cedrosanum*
Nombre común.....*Sotol, cortadillo, cuchara del desierto*

El *Dasyliirion* es una planta cuyo nombre común es sotol o sereque y pertenece a la familia de las *Nolinaceae* las cuales se clasifican en árboles y arbustos de hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada, de color verde, cuya parte aprovechable para la elaboración del sotol, es la piña o cabeza. Son propias de los desiertos o de los climas cercanos al tipo desértico. Su apariencia es de palmeras altas, o de hierbas con grandes inflorescencias.

EL sotol (*Dasyliirion ssp.*) es originario del noreste de los Estados Unidos y del Norte de México. *Dasyliirión* significa lirio grueso y succulento. El nombre fue usado primeramente por Zuccarini (1838). Esta planta se caracteriza por ser dioica, y tienen una roseta densa de hojas fibrosas y con espinas en los márgenes que radian hacia fuera de las coronas, algunas especies son semiarborescentes. Las cabezas o piñas pueden llegar a pesar hasta 100 Kg. Estas plantas son polícarpicas y producen espigas elongadas con agrupamientos densos de flores unisexuales. La floración se presenta durante el verano, la polinización es principalmente entomófila y las semillas son dispersadas principalmente por el viento. El sotol es una planta que resiste las condiciones ambientales extremas del semidesierto mexicano, tolera temperaturas bajas de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, y temperaturas altas del verano de más de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, se localiza en altitudes de 900 a 1800 msnm (García, 1952)

2.9.2 Antecedentes del sotol

La bebida de sotol es extraída y producida en el Estado de Chihuahua existen vestigios que el sotol ha sido fabricado en dicho estado desde hace más de 800 años por los pobladores del Paquimé, después de las diferentes tribus de indígenas y apaches, siguiéndolos los españoles quienes implantaron métodos de destilación más eficaces y desde entonces a la fecha por los pobladores de dicho territorio, han rodeado este producto de historias, mitos y leyendas. Se han encontrado restos de la planta del sotol, en la Cueva de la Olla, cuya antigüedad data de la fase Buena Fe que va del 1060 al 1205 D.C., dichos restos fueron encontrados en el granero de la citada cueva en el municipio de Madera.

En Paquimé, que data del 205 al 1260 D.C. se encuentran ya vestigios de hornos sotoleros, lo que indica que algunas de las tribus habitaban lo que hoy es el estado de Chihuahua, como son los anasazis, los tarahumaras, los tobosos y los apaches. En este periodo debe haber surgido el origen de la palabra sotol, el cual proviene del náhuatl tzotollin. En la época colonial se introduce el proceso de destilación en la elaboración del sotol que se elaboraba en la Nueva Vizcaya, proceso que introdujeron los españoles y en particular los franciscanos, durante los siglos XVI, XVII y XVIII. Fue hasta entonces que comenzaron a fabricarse y beberse alcoholes destilados. En el siglo XIX los apaches siguieron usando sotol, y a principios del siglo XX ya se comercializaba el sotol en barril con un precio determinado. En los tiempos de la revolución se utilizó el sotol de nueva cuenta para prevenir enfermedades reconociéndose propiedades curativas.

La producción del Sotol en el Estado de Coahuila data de principios del siglo XX, cuando en 1908 se construye una vinata en Parras de la Fuente, Coahuila, dedicándose por más de 40 años a la producción y venta de sotol. Posteriormente se forman más empresas dedicadas a la actividad de producción y venta de sotol en los años de 1940, 1960 y 1982. Por último, la bebida de Sotol también es producida en el Estado de Durango, ya que la especie *Dasyilirion*, se reproduce de manera silvestre en todos los municipios de esta entidad federativa (IMPI, 2002).

En la parte noroeste del estado de Zacatecas se elabora sotol y no se encuentra dentro de la denominación de origen.

2.9.3 Otros usos del sotol

Los nativos de Arizona, usaban los corazones de las plantas obteniendo un alimento similar al que se obtiene del maguey y además una bebida conocida como sotol. Los habitantes de las cuevas de los ríos Grande y Pecos y en el área de la cultura Lipán, cocinaban en pozos con piedras calientes, a manera de tatema y del centro ya cocido hacían una harina para preparar panecillos o tortas. Los mezcaleros y los chiricahuas utilizaban el sotol en la misma forma que la planta del maguey comiendo las partes más tiernas. Los apaches comían los tallos tiernos de las flores como una legumbre. En el Río Grande y el Río Pecos usaban las hojas los nativos para hacer sandalias y canastas, al igual que los tarahumaras.

2.9.4 Sotol

2.9.4.1 Definición de sotol

Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica ubicada dentro de la denominación de origen, derivado de la molienda de las cabezas maduras de *Dasyliirion ssp.*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido por otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49%, en la inteligencia de que en esta acción o mezcla no están permitidas las mezclas en frío. El sotol es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas, o cuando se aboque sin madurarlo. (NOM-159-SCFI-2004).

2.9.5 Tipos de sotol

2.9.5.1 Sotol blanco

Producto cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

2.9.5.2 Sotol joven

Producto susceptible de ser abocado, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de sotol blanco con sotol reposado y/o añejo de 1 a 2 meses, se considera como sotol joven u oro.

2.9.5.3 Sotol reposado

Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, u otras alternativas tecnológicas, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes sotoles reposados, la edad para el sotol resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

2.9.5.4 Sotol añejo

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble, encino, acacia, castaño, haya, fresno, cuya capacidad máxima sea de 210 litros u otras alternativas tecnológicas y con una graduación alcohólica comercial que debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes sotoles añejos, la edad para el sotol resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

2.9.6 Elaboración artesanal de sotol en Cedros Zacatecas

La producción de sotol en San Pedro de Cedros, Zacatecas se realiza de una manera artesanal, sin previos cuidados de sanidad, sin ninguna estandarización de proceso se puede decir que sin ningún control de calidad. Sin embargo las personas encargadas de la elaboración confían en su empirismo que han adquirido por los años, y por lo cual elaboran un sotol de calidad variable. El diagrama de flujo se muestra en la Fig. 2

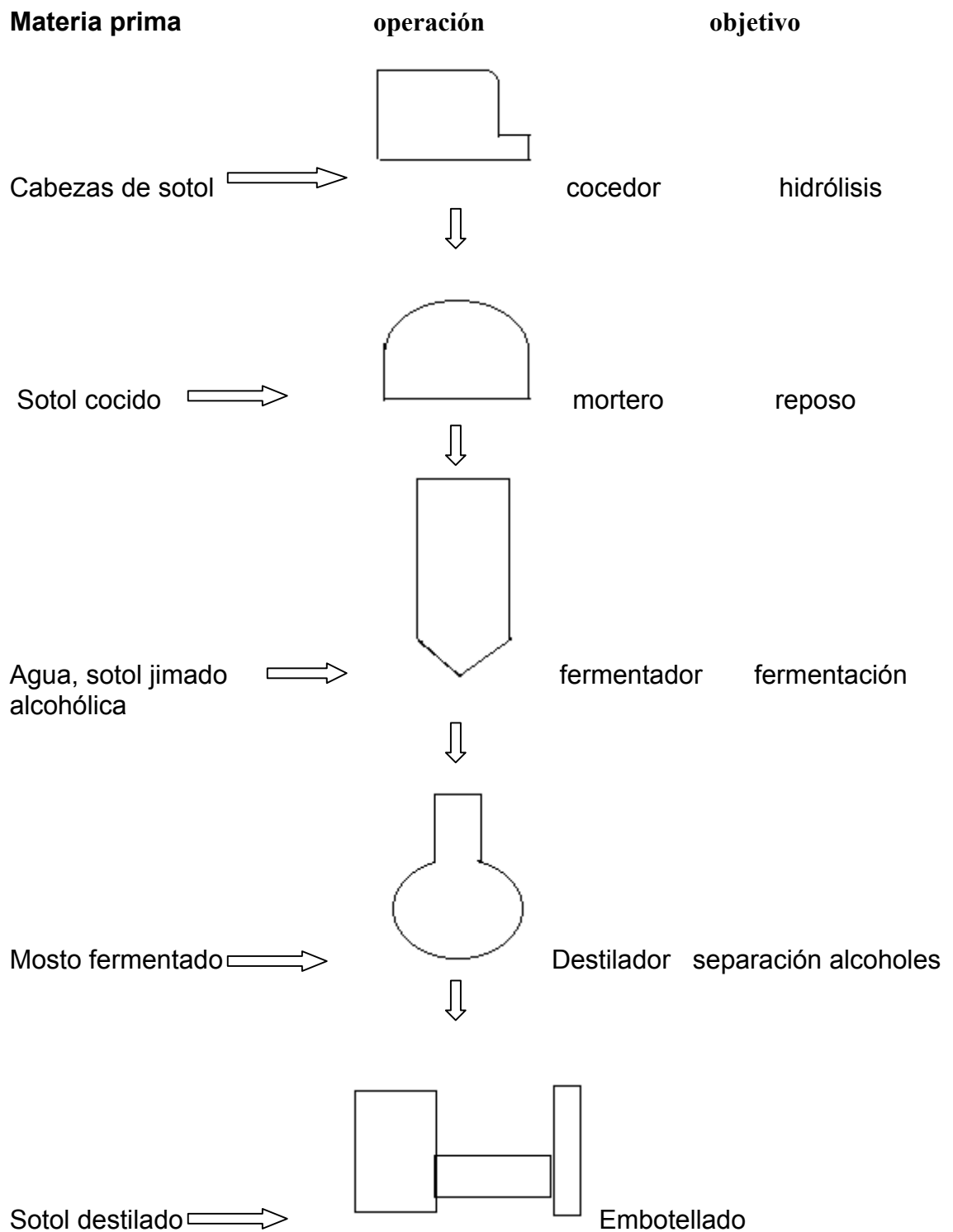


Fig. 2 Diagrama de flujo de elaboración de Sotol.

2.9.6.1 Corte de sotol y Recepción

El sotol es cortado con un hacha Fig. 3 y transportado hacia la vinata a un almacén temporal Fig. 4 Las cabezas de sotol se seleccionan sé usan las que hayan alcanzado un mínimo de 50 Kg.

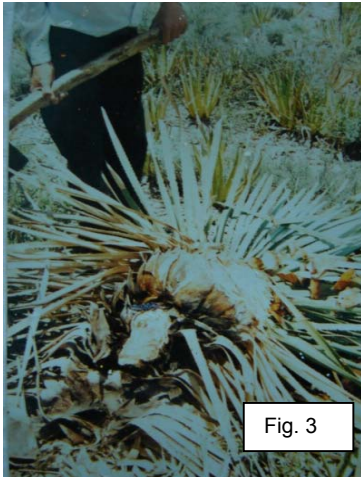


Fig. 3

Fig. 3 Corte de la planta de sotol



Fig. 4

Fig. 4 Acarreo de las cabezas de sotol

2.9.6.2 Cocimiento y molienda de sotol

Las mismas que al llegar a la vinata se someten a una cocción por un método llamado tatemar o asador de piedra Fig. 5 con cuatro chimeneas Fig. 6. El horno consiste en una pirámide de piedra en donde se lleva acabo la hidrólisis de los azucares mediante cocimiento con vapor por un tiempo de 72 hrs.

Se le prende fuego Fig 7 y hasta que las piedras se hayan de color cenizo (indica que ya están calientes) se colocan las cabezas de sotol acomodándolas en forma del horno Fig 8, con mucho cuidado evitando quemarse, se tapa el horno con suadero (palma samandoca) y tierra, esto ayuda a que no se escape el vapor. A las 24 hrs se abren las chimeneas y se le agregan 20 botes de agua distribuidos en los cuatro puntos. Con esto se consigue generar vapor para evitar resequedad en el sotol y que se termine de cocer.



Fig. 5 Horno de piedra



Fig. 6 Chimenea



Fig. 7 Horno encendido



Fig. 8 Colocación de las cabezas de sotol

El sotol cocido Fig. 9 es pasado al área de majar el cual consiste en martajar las cabezas con un hacha Fig. 10, con el fin de disminuir su tamaño aquí se obtiene el sotol en forma de fibra (no hay extracción de jugo). Ya que se lleno el mortero Fig. 11 se pisotea fuertemente para que no queden huecos sin llenar Fig. 12 Aquí el sotol tiene que pasar por un reposo de 96 o 120 hrs o según lo determinen los encargados del proceso, para cerciorarse de que ya esta listo, introducen un palo en tres partes distribuidas del mortero y revisan temperatura el cual debe estar caliente, al tacto Fig. 13 y olor a vino Fig. 14. Una vez alcanzado estos calificativos el sotol pasa a pila de fermentación



Fig. 9 Sotol cocido



Fig. 10 Majado



Fig. 11 Mortero lleno



Fig. 12



Fig. 13



Fig. 14

Fig. 12 Pisoteo

Fig. 13 Monitoreo de temperatura

Fig. 14 Monitoreo de olor

2.9.6.3 Preparación del mosto y fermentación

Una vez pasado el tiempo y estando listo el sotol con las anteriores características se conduce a la pila de fermentación: Fig. 15. Lo mas rápido posible para evitar perdida de calor del sotol, la pila se llena de agua a la mitad de su capacidad (1.80 m largo ,1.20 m de ancho). Una vez vaciado el mortero en el tanque se pisotea el sotol para apelmazar de manera de que quede apretado Fig. 16. Se deja a la intemperie que le den los rayos del sol Fig. 17y 18 para proporcionar temperatura con el cual aumenta la actividad de las levaduras produciendo CO_2 los sotoleros le llaman hervor. Aquí el mosto se fermenta por un tiempo de 72 a 96 hrs. hasta que deje de producir CO_2 Los azúcares serán convertidos a alcohol principalmente el etílico. La cruz que aparece en el tanque de fermentación es colocada por los señores y esto es para que Dios le cuide la fermentación.



Fig. 15

Fig. 15 Llenado de la pila de fermentación



Fig. 16

Fig. 16 Pisoteo del sotol



Fig. 17 Tanques en fermentación



Fig. 18 Tanque en fermentación

2.9.6.4 Destilación

Una vez terminada la reacción de fermentación, el mosto es cargado en el caso del destilador para su destrozamiento o primera destilación. El sotol es sacado por partes del tanque de fermentación (Fig. 19)



Fig. 19 Sotol fermentado para destilar

La destilación se realiza con fuego moderado para obtener una destilación por goteo el tiempo que tarda en el fuego cada cazo es de 4 hrs. En esta destilación se recibe la cabeza la cual la consideran como agua vino (17°GL) la van juntando en garrafas para la refinación. La segunda destilación se hace con fuego aun más suave que el primero y es lento, el sotol obtenido en esta destilación es de 55°GL .

El destilador consta de un caso Fig. 20 una cabeza de Moro este es de madera Fig. 21, un serpentín con refrigerante Fig. 22, un horno para producir calor Fig. 23. La vista general del destilador se muestra en la Fig. 24. El recibimiento del destilado se muestra en la Fig. 25, y la forma en como se mide la graduación alcohólica en la Fig. 26.



Fig.20

Fig. 20 Cazo



Fig.21

Fig. 21 Cabeza de moro



Fig.22

Fig. 22 Serpentin con refrigerante



Fig.23

Fig. 23 Horno del destilador



Fig.24

Fig. 24 Destilador

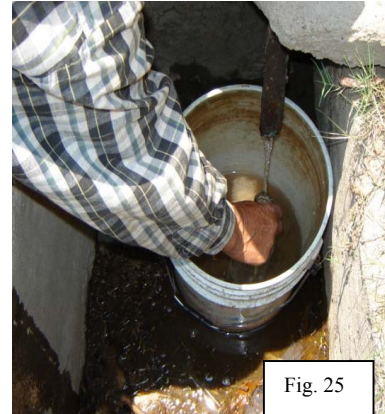


Fig. 25

Fig. 25 Salida del destilado



Fig. 26

Fig. 26 Graduación del destilado

2.9.6.5. Almacén y dilución del sotol

El sotol obtenido es almacenado en garrafas y toneles destinados para este propósito Fig. 27. Al sotol destilado se le hace una dilución con alcohol de las cabezas. Así el producto final queda con una graduación alcohólica de 50 °GL Fig. 28



Fig. 27

Fig. 27 Almacenaje



Fig. 28

Fig. 28 Graduación final

2.9.6.6 Envasado

El envasado se realiza ya que se va a vender debido a que no cuentan con logotipo, marca ni botellas propias para vender su producto Fig. 29. En Cedros la producción de sotol es una vez por mes, y la venta se lleva a cabo con personas del mismo lugar o con los visitantes que llegan a la comunidad.



Fig. 29

Fig. 29 Envasado de sotol

3. MATERIALES Y METODOS

DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó conforme a las siguientes etapas:

Etapa 1: Recolección de muestras a partir de las pilas de fermentación.

Etapa 2: Monitoreo de la fermentación de sotol a nivel artesanal

Etapa 3: Siembra de microorganismos, a partir de la cinética de fermentación del mosto de sotol.

Etapa 4: Aislamiento de colonias de levaduras observadas por estereoscopio.

Etapa 5: Purificación de las levaduras aisladas.

Etapa 6: Aplicación de pruebas Fisiológicas, (fermentación, asimilación de carbohidratos, asimilación de nitratos)

Etapa 7: Aplicación de prueba de esporulación.

Etapa 8: Realización de cinéticas de fermentación de las levaduras aisladas

3.1 Etapa 1: Extracción de muestras a partir de las pilas de fermentación.

Se escogió la región de Cedros Zacatecas que se encuentra ubicado al Norte de la República Mexicana. Cedros se localiza en la región noreste del estado de Zacatecas, las coordenadas geográficas son de 101° 46' 15'' de longitud del meridiano de Greenwich, 24° 40' 45'' de latitud y 2° 7' de longitud al meridiano de México, su altura es de 1770 mil msnm a una distancia de Saltillo Coahuila de 160 Km .Se extrajo las muestras de mosto de sotol del tiempo final de fermentación la cual procede de los asientos de la pila de fermentación. A continuación se colocaron en garrafas de cinco litros con hielo en la parte externa.

3.2 Etapa 2: Monitoreo de la fermentación de sotol a nivel artesanal

El mosto llegado al laboratorio se paso a un matraz de 1 litro y se le hicieron los análisis correspondientes de pH, acidez titulable, azúcares reductores (con la técnica de D.N.S Miller 1956.) azúcares totales, (fenol-sulfúrico Dubois 1956), grado alcohólico (con picnómetro). Mediante los métodos establecidos por el AOAC en 1980. Se le agrego 1gr/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se incubo a 30 °C, se siguió una cinética de fermentación hasta el agotamiento máximo de azúcares

3.3 Etapa 3: Siembra de microorganismos, a partir de la cinética de fermentación del mosto de sotol.

Del mosto fermentado en el laboratorio se hicieron diluciones de hasta 10^{-4} se tomo 0.1ml de este y se inoculó con varilla, en placas con medio de cultivo YMA (wickerham, 1951) en campana de flujo laminar previamente esterilizada evitando contaminaciones cruzadas. Las cajas con crecimiento levaduriforme se incubaron a 25°C por un tiempo de 48hrs. Se hicieron tres repeticiones.

3.4 Etapa 4: Aislamiento de colonias de levaduras observadas macroscopicamente y microscópicamente.

Después de 48 hrs. de incubación, las placas con crecimiento característico de hongos levaduriformes fueron observadas al estereoscópico y microscopio, con el objetivo de distinguir la presencia de más de 1 morfología de colonias y diferentes

formas de células. Las características morfológicas que se tuvieron en cuenta fueron: color, forma, elevación, consistencia, bordes, superficie.

Cada colonia morfológicamente distinta se resembró en una placa de agar YMA por el método de agotamiento en estrías, y se incubaron a 25°C por 48 hrs. para obtener colonias aisladas en cultivo puro.

3.5 Etapa 5: Purificación de las levaduras aisladas.

La purificación de levaduras se realizó de la siguiente manera

Las levaduras contaminadas de bacterias se purificaron con ampicilina a diferentes concentraciones partiendo de 0.1gr por cada 100ml de medio de cultivo selectivos YMA PDA y YPD

Para purificar levaduras de levaduras silvestres se utilizaron los siguientes métodos: estría cerrada, estría de cuatro cuadrantes, diluciones, crecimiento en $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$. Para estos métodos se utilizaron placas de cultivos PDA, YPD, YMA y se incubaron a 25°C por 48 hrs.

Una vez purificadas las cepas de levaduras se pasaron en placas de crecimiento YPD en el cual se observó muy bien las diferencias de las colonias y del tamaño de las células.

3.6 Etapa 6: Aplicación de pruebas Fisiológicas, (Pruebas bioquímicas de fermentación, asimilación de carbohidratos, asimilación de nitratos)

A partir de una colonia aislada y tras verificar su pureza de las cepas en el microscopio compuesto (100x), se procedió a realizar los estudios morfológicos y fisiológicos necesarios para identificar el género de la levadura aislada.

Para las pruebas bioquímicas de las cepas de levaduras se hizo un protocolo como sigue:

Se preparó la cepa en un medio de cultivo Sabouraud de 48 hrs. de crecimiento a 35°C a partir de esta placa se pasó la levadura al medio sintético de fermentación, asimilación de carbohidratos y de nitratos.

3.6.1. Pruebas bioquímicas de fermentación

En las pruebas bioquímicas de fermentación se utilizó la técnica recomendada por Collins *et al*, (1999). El medio es vaciado en tubos de ensaye con campana Durham previamente esterilizados en autoclave, el carbohidrato es esterilizado con filtro de membrana milipore (previamente estéril), con el cual se le adiciona al medio basal de fermentación en una concentración del 3-5% p/v. Los carbohidratos utilizados en esta prueba fueron: glucosa, sacarosa, galactosa, maltosa, rafinosa, fructosa, melibiosa lactosa, levulosa manosa. Se incubaron a temperatura de 25 °C. Las observaciones a revisar fueron producción de CO₂ y cambio de coloración del medio basal en 24 hrs. Las levaduras que dieron negativas en este tiempo se dejaron por un periodo de siete días hasta observar algún cambio del medio.

3.6.2 Asimilación de carbohidratos

En el análisis de asimilación de carbonos se usó el sugerido por Collins *et al*, (1999). Los carbohidratos usados son los siguientes: galactosa, maltosa, rafinosa, lactosa, melibiosa sacarosa y glucosa como testigo. El carbohidrato se esterilizó con filtro de membrana, agregándole al medio sintético del 3-5% p/v La siembra se realizó por triplicado partiendo de la primera placa a la segunda y de la segunda a la tercera cada una debía haber tenido un crecimiento de 48 hrs.

3.6.3 Asimilación de nitrato

La técnica fue la misma que la anterior y las fuentes nitrogenadas fueron : urea, aspargina, nitrato de potasio, sulfato de amonio y peptona como testigo. La siembra se realizó por triplicado partiendo de la primera placa a la segunda y de la segunda a la tercera cada una debía haber tenido un crecimiento de 48 hrs.

3.7 Etapa 7: Aplicación prueba de esporulación

Para inducir la esporogénesis en las cepas de levadura se colocaron en medios especiales para esporular que son los siguientes: acetato de sodio (Collins *et al* 1999), Gorodkova modificado (Wickerham, 1951), Extracto de malta (Wickerham,

1951), yeast extrac-glucose (Fowell, 1951). Se tomo una asada con suficiente inculo se sembró por estría cerrada y se incubaron a 25°C durante 10 días

3.8 Etapa 8: Realización de cinéticas de fermentación de las cepas de levaduras aisladas

A cada cepa de levadura del género de *Saccharomyces* se le realizó por triplicado una cinética de fermentación por individual

A la cepa se le preparo de la siguiente manera la levadura se coloco en placas de crecimiento Sabouraud a una temperatura de 25 °C por 48 hrs.

Una vez obtenido el crecimiento, la cepa se paso para la preparación del inculo, el medio enriquecido contenía glucosa peptona extracto de malta se le ajusto el pH a 5 con H₂SO₄ al 1%, se incubo a 28 °C con agitación moderada, durante 48 hrs.

Pasado el tiempo para inducir el crecimiento del inculo se procedió a vaciar el 10 % del volumen en el medio de fermentación, el cual mantuvo la misma composición que el del inculo, en una cantidad de 1000 ml. el carbohidrato que se uso fue glucosa es cual se esterilizo por medio de filtro de membrana. Se incubo a temperatura de 25°C sin agitación durante 72 hrs.

Se realizó un monitoreo cada 12 hrs. con mucho cuidado evitando producir aeración y contaminación. Las muestras fueron sacadas en campana de flujo laminar. Para determinar y trazar la cinética de fermentación de cada cepa. Los análisis realizados fueron los siguientes. pH (potenciómetro), acidez titulable (AOAC 1980), azucares reductores (Miller 1956).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las levaduras aisladas se han utilizado con excelentes resultados en muchos países, obteniendo productos finales de calidad mas uniforme que los que se producen con las fermentaciones espontáneas (Fleet *et al*, 1993). Debido a ello para el aislamiento de levaduras se escogió la zona de Cedros, Zacatecas ya que evidentemente se trata de una fermentación espontánea, en donde las pilas de fermentación nunca se han inoculado, por lo cual las cepas que se aislaron son cepas autóctonas de la región.

4.1 Etapa 1: Extracción de muestras a partir de las pilas de fermentación.

Las muestras de sotol se pudieron tomar gracias a la buena disposición de los señores encargados de la vinata.

4.2 Etapa 2: Monitoreo de la fermentación de sotol a nivel artesanal

Con la finalidad de aislar únicamente a las levaduras tolerantes al etanol nombradas en la literatura se realizó esta cinética para seguir el aumento del grado alcohólico y conseguir aislar únicamente las levaduras productoras de alcohol, que es el objetivo de la investigación se siguió un monitoreo de la fermentación alcohólica ya iniciada en las pilas de fermentación de la industria para trazar la cinética de la Fig.30 con los resultados mostrados en la tabla 3

Tabla 3 Análisis del mosto

Tiempo (hr)	pH	Acidez titulable (g/L de ac. tartárico)	Azúcares reductores (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Grado alcohólico
0	3.6	0.949	43.53	60.3911	17
24	3.5	0.987	40.93	50.99	27
48	3.4	1.18	39.042	38.2466	35
72	3.0	1.248	34.024	36.0461	40
96	2.8	1.54	20.14	34.0245	45

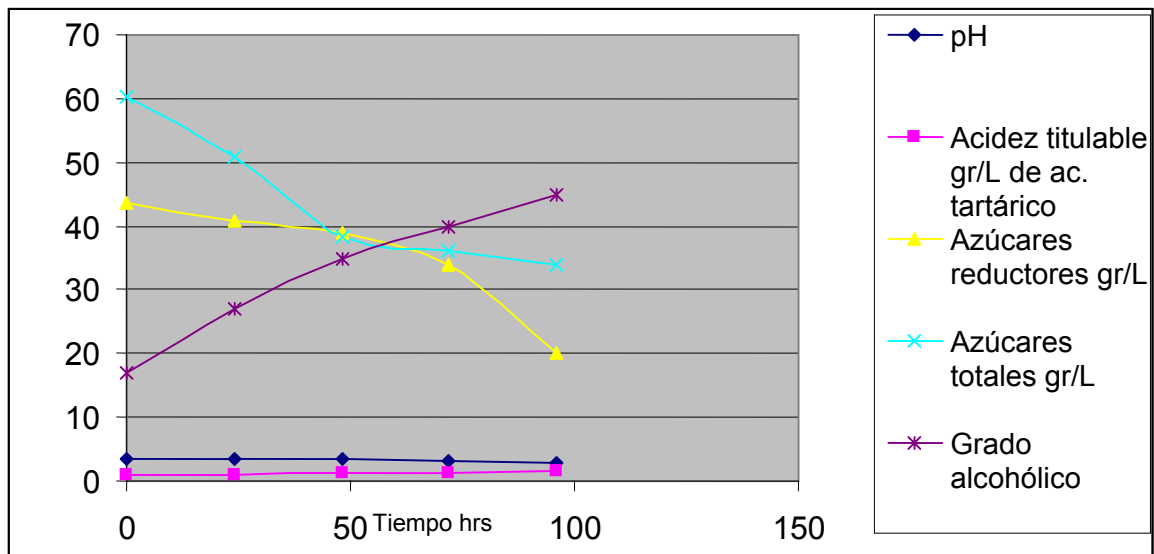


Fig. 30 Cinética de fermentación

El mosto analizado contenía gran cantidad de azúcares reductores lo cual demuestra que no se consumen totalmente, la cantidad de azúcares totales fue mayor que la de los reductores, conforme transcurrió el tiempo de fermentación fueron bajando tanto reductores como totales y el grado alcohólico aumento. El eje de las Y muestra la concentración del mosto

A mediada que el valor del pH bajaba la de la acidez aumentaba. Estos factores están determinados por la presencia de bacterias acéticas y lácticas en las fermentaciones alcohólicas.

4.3 Etapa 3: Siembra de microorganismos del mosto de sotol.

Después del tiempo de incubación fijado en las placas inoculadas, el crecimiento que se obtuvo fue de una flora microbiana muy heterogénea en la cual se presentaban bacterias, hongos y levaduras.

Por lo cual se puede decir que las fermentaciones espontáneas se encuentran amenazadas de seguir diferentes rutas metabólicas de los microorganismos presentes. En consecuencia se obtendría una variedad de productos diferentes al alcohol.

Se presentaron un gran número de levaduras silvestres las cuales producen olores indeseables. Se aisló una colonia de estas que es la mas notable por su aspecto y la intensidad del olor producido.

4.4 Etapa 4: Aislamiento de colonias de levaduras observadas macroscópicamente y microscópicamente.

Después del tiempo de incubación las colonias fueron caracterizadas morfológicamente basándose en los códigos siguientes:

Tabla 4 Caracterización de colonias de levaduras

Levadura	Color	Forma	Elevación	Consistencia	Bordes	Superficie
No 1	Amarilla	Circular	Pulvinada	Suave	Enteros	Lisa
No 2	Blanca	Circular	Convexa	Suave	Enteros	Lisa
No 3	Blanco grisáceo	Circular	Convexa	Suave	Irregulares	Rugosa

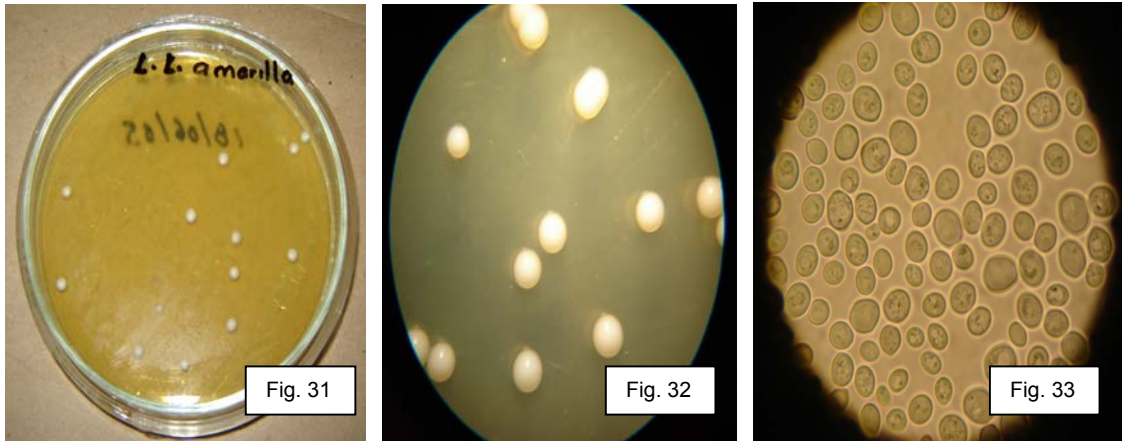
4.5 Purificación de las levaduras aisladas

La obtención de cultivos axenicos de las cepas de levaduras se realizaron en medios selectivos de YMA, YPD

Las cantidades de ampicilina que se adicionaron fue hasta 0.250 gr. por 100ml con esto se logro purificar las cepas de levaduras de las bacterias.

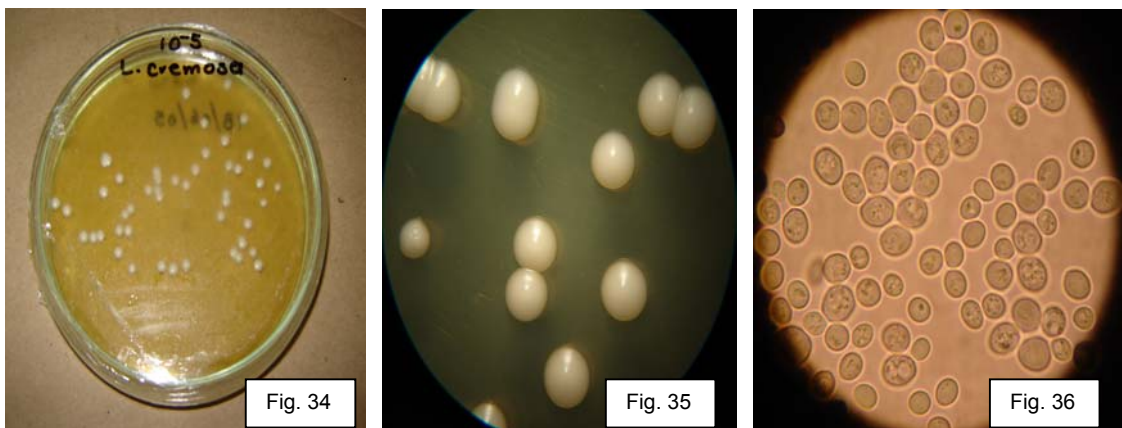
La purificación de las cepas de levaduras de otras levaduras silvestres se logro con la adición de sulfato de amonio al medio y la siembra de estría en cuatro cuadrantes.

Las Fig. muestran las colinas en placas en medio de crecimiento YPD observadas en estereoscopio y la forma de la célula en el microscopio compuesto (100X) usando aceite de inmersión.



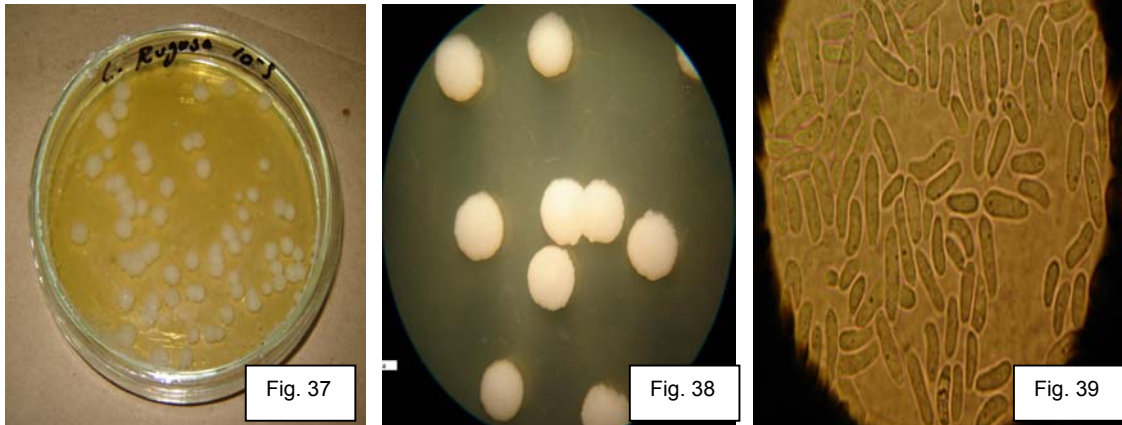
Las Fig. 31,32 y 33 corresponde a la Levadura amarilla Cepa 1

La Fig. 31 Placas en crecimiento YPD y la Fig. 32 son colonias de levaduras observadas en estereoscopio la Fig. 33 muestra la morfología de la célula en cultivo puro . la forma de la celula es redonda



Las Fig. 34, 35 36 corresponden a la levadura cremosa cepa 2

La Fig. 34 se puede observar la placa con crecimiento en medio YPD y la Fig. 35 muestra las colonias de levaduras observadas en estereoscopio, mientras que la Fig. 36 muestra la morfología de la célula en cultivo puro. La forma de la celula es redonda.



Las Fig. 37, 38, 39 corresponden a la levadura rugosa cepa 3

En la Fig. 37 se observa la placa en crecimiento en medio YPD la Fig. 38 Colonias de levaduras observadas en estereoscopio Fig. 39 Morfología de la célula en cultivo puro la forma de la célula es alargada

4.6 Etapa 6: Aplicación de pruebas fisiológicas (Pruebas bioquímicas de fermentación, asimilación de carbohidratos y asimilación de nitratos)

4.6.1 Pruebas bioquímicas de fermentación

Cada levadura aislada y purificada se inoculo en cada medio basal de fermentación (Collins *et al* 1999) con los carbohidratos mostrados en el Tabla 6.

Pasadas las 24 hrs. y observados los cambios en el medio basal así como la producción de CO₂ en la campana Durham, los resultados son los siguientes.

El calificativo de positivo se le dio a la levadura que presentó producción de CO₂. Y negativo para la levadura que no presentó CO₂

Tabla 5. Pruebas bioquímica de fermentación en sotol.

Levadura	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Rafinosa	Galactosa	Lactosa	Fructuosa	Melibiosa	Levulosa	Manosa
No 1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
No 2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
No 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las cepas 1 y 2 presentaron resultado negativo para lactosa, este carbohidrato no es fermentado por el genero *Saccharomyces* (Lodder 1970). En cambio la cepa 1

fue la única que produjo CO₂ en presencia de melibiosa y la cepa 3 no fermento ningún carbohidrato, los resultados obtenidos fueron negativos

Las leyes de Kluyver Dekker son de gran importancia en los estudios bioquímicos sencillos de fermentación producidos por las levaduras. Ya que estos estudios permiten la diferenciación sistemática de las levaduras. Estos enunciados señalan lo siguiente:

1. Toda levadura que no fermenta la glucosa, no fermenta ningún otro azúcar.
2. Toda levaduras que fermenta la glucosa, fermenta además, levulosa y manosa.
3. Ninguna levadura puede fermentar a la vez, maltosa y lactosa. (Phaff *et al* 1978)

Basados en estos principios la cepa 3 cumple con el primero no fermenta glucosa y por lo tanto ningún otro azúcar las cepas 1 y 2 fermenta glucosa, y por lo tanto levulosa y manosa. También fermentan maltosa pero no lactosa

La capacidad de ciertas levaduras para atacar a la rafinosa y a la melibiosa se ha empleado como un ensayo diferencial y como ayuda en la clasificación del genero de *Saccharomyces* Estelling – Dekker (Prescott, 1962)

4.6.2 Asimilación de carbohidratos

Los resultados en las pruebas de asimilación de carbohidratos se muestran en la Tabla 6

Tabla 6 . Asimilación de carbohidratos

Levadura	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Galactosa	Lactosa	Fructuosa	Melibiosa
Cepa 1	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++
Cepa 2	+++	+++	+++	+++	+-	+++	---
Cepa 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---

Los códigos se dan por triplicado debido a que las levaduras se sembraron tres veces cada signo es igual a cada siembra.

Las cepas 1 y 2 no asimilan lactosa, pero si glucosa, sacarosa, maltosa, galactosa y fructosa. La cepa 1 es la única que asimila a la melibiosa en cambio la cepa 3 asimila muy bien todos los carbohidratos.

Al considerar los azúcares como fuentes de carbono hay que observar la diferencia que puede existir entre la capacidad de una levadura para asimilar un azúcar y su capacidad para fermentar el mismo, como es el caso de la cepa 3 (Phaff *et al* 1978).

La capacidad para asimilar un compuesto determinado varia con las diferentes clases de levadura como en el caso de el genero de *Saccharomyces* que no asimilan Lactosa (Lodder 1970 y Kreger-Van Rij, 1984).

La glucosa fructosa y manosa se asimilan bien por la mayor parte de las levaduras. No se conoce ninguna especie de levadura capaz de asimilar celulosa o hemicelulosa y solo algunas especies sin importancia industrial, segregan amilasas, necesarias para la utilización del almidón (Prescott, 1962)

4.6.3 Prueba asimilación de nitratos

Las cepas de las levaduras evaluadas en esta prueba presentaron los siguientes resultados

Tabla 7 Asimilación de nitratos

Levadura	Peptona	(NH ₂) ₄ SO ₄	KNO ₃	Urea	Aspargina
No 1	+++	+++	- - -	++-	+ +-
No 2	+++	+++	- - -	++-	+ + -
No 3	+++	+++	+++	++-	+++

La peptona en esta prueba se tomó como testigo por lo cual la asimilación fue positiva en las tres levaduras y positiva también para sulfato de amonio. Las levaduras 1 y 2 no asimilan nitrato de potasio, lo cual es una característica de las levaduras del genero *Saccharomyces*. (Lodder 1970 y Kreger-Van Rij, 1984). La

urea y la aspargina se asimilaron ligeramente. La cepa 3 asimila todos los nitratos en especial el nitrato de potasio.

Sólo pocas levaduras son capaces de asimilar el nitrógeno de los nitratos; las especies del genero *Hansenula* tienen esta capacidad (Lodder 1970).

Por lo general, los aminoácidos son asimilados aunque no todos, los que mejor se asimilan por las levaduras son alanina , aspargina, ácido aspartico, ácido glutámico, leucina y valina (Jørgensen 1959).

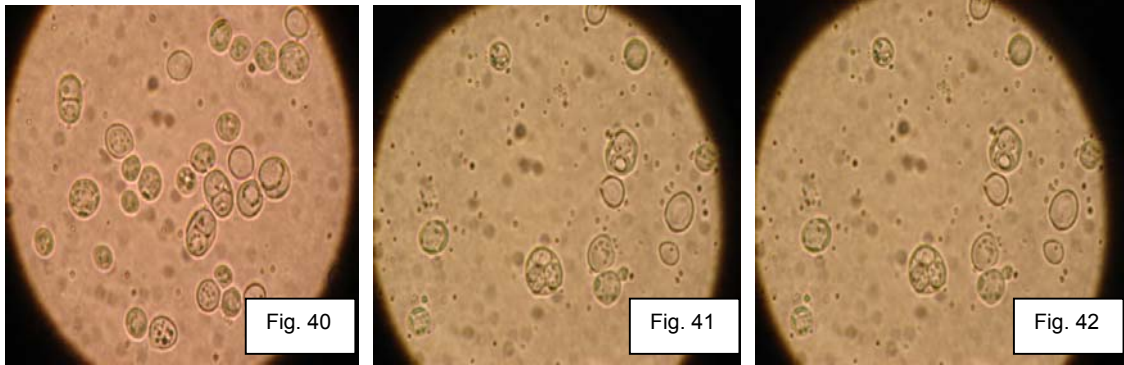
Erich (1907) demostró que los aminoácidos que pueden ser utilizados por la levadura, primero deben ser transformados en amoniaco y el alcohol superior desaminado antes de que pueda ser utilizado el nitrógeno.

El aprovechamiento de los péptidos simples no ofrecen problemas por que son aprovechados por la levadura, se hidrolizan a aminoácidos antes de que se lleve acabo la asimilación o desasimilación (Jorgensen, 1959)

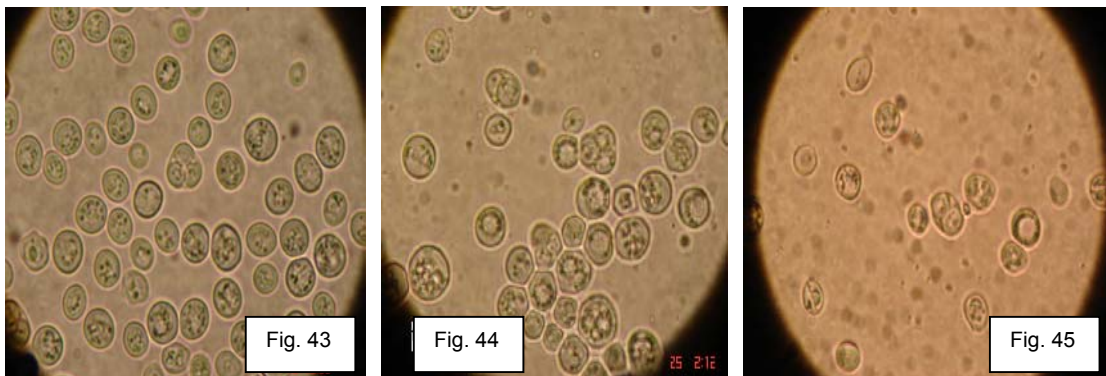
4.7 Etapa 7: Prueba de esporulación.

Una vez incubadas las placas con medio para inducir la esporulación se estuvieron revisando cada 24 hr. por medio de frotis *in vivo*, hasta observar la aparición de esporas en las ascas de las células de las levaduras. ya se mencionó la producción de ascosporas en las levaduras es determinante para la determinación de genero

En las cepas 1 y 2 sembradas en los medios de esporulación las esporas formadas fueron en cantidad de 1 a 4 por asca y redondas.



Las Fig. 40 41 42 corresponden a la levadura amarilla cepa 1 la Fig. 40 muestra la Formación de ascas y la Fig. 41 Ascas trisporada a si como la Fig. 42 se muestran esporas germinando las Fig. fueron tomadas en diferentes tiempos



Levadura Cremosa cepa 2

La Fig. 43 muestra la Formación de ascas la Fig. 44 Ascas trisporada y la Fig. 45 Esporas germinando

Con estas características obtenidas y observadas se hacen las siguientes aseveraciones la cepa 1 que es la levadura amarilla y la cepa 2 levadura cremosa corresponden al género de las levaduras esporógenas como anteriormente se comentó en la literatura las levaduras que producen mayor cantidad de alcohol pertenecen a este género que son las *Saccharomyces*. El cual presenta las siguientes características que son: células gemantes sueltas, redondas como se mostró en las Fig. 33 y 34 en la conjugación precede a la formación de ascas; esporas redondas de una 1 a 4 por asca, las esporas pueden conjugarse el metabolismo junto al oxidante, siempre es fermentativo; el nitrato de potasio no fue asimilado por estas cepas.

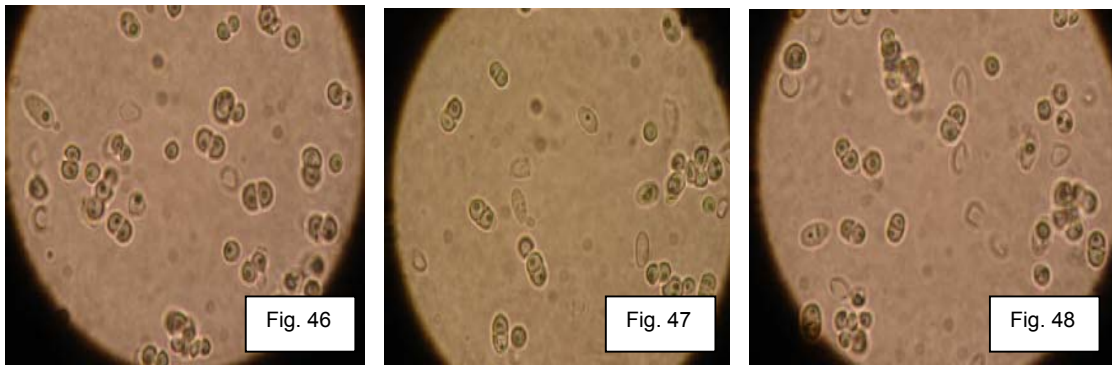


Fig. 46 Formación de ascas Fig. 47 Ascas biesporadas Fig. 48 Esporas germinando

En la cepa 3 Fig. 46 se muestran las esporas que son redondas o apiculadas con un filete alrededor del centro de punta a punta y con un granulito central refringente. Estas características corresponde al género de *Hansenula* este género se caracteriza también por lo siguiente que son: células gemantes sueltas de forma alargada como se pudo apreciar en la Fig. 39 e tipo de metabolismo es oxidativo por los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas fermentación y asimilación formación de película en la fermentación como en la Fig., y la asimilación de nitrato de potasio fue positiva.



Fig. 52 Formación de película en el mosto de sotol

La esporogénesis no se debe evaluar en un solo sustrato ya que si la levadura no esporula en alguno no se debe considerar como no esporogena. De igual manera se le debe dar las condiciones óptimas de esporulación, como pH, oxígeno y sustancias nutritivas así como el uso de un cultivo joven (Lodder 1970).

El mejor sustrato en que se pudo observar muy bien la esporulación en las cepas 1 y 2 fue en el de acetato de sodio con pH de 6.2 a una temperatura de 25°C. En un tiempo de 10 días. Debido a que el medio de cultivo de acetato de sodio es particularmente efectivo para *Saccharomyces* (Phaff *et al*, 1978). Y la cepa 3 presentó muy buena esporulación en el medio de cultivo Gorodkova a temperaturas de 25-30°C en un tiempo de cinco días. Las levaduras que forman ascosporas (esporogenas) han sido clasificadas por Stelling-Dekker (1931), (Phaff, *et al*, 1978).

La formación de esporas como característica de especie ha alcanzado cierta importancia, sobre todo en las cervecerías, para identificar la levadura silvestre como contaminación de la levadura cultivada (Jôrgensen, 1959).

4.8 Etapa 8: Realización de cinéticas de fermentación en las cepas de levaduras aisladas

La caracterización fermentativa de las dos levaduras aisladas se realizó a nivel matraz con el carbohidrato glucosa la cinética de cada cepa de levadura se muestreo cada 12 hrs. hasta el agotamiento de los azúcares; una vez concluido el consumo de estos los mostos muertos se destilaron. Los resultados de la levadura amarilla cepa 1 se muestran en la tabla 8 para trazar la cinética de la Fig.50

Tabla 8 Resultados de la levadura amarilla cepa 1

Tiempo	pH	Acidez titulable gr/100ml ac.tartarico	Azucares reductores gr/lt	Azucares totales gr/lt
0	5	0.07184	30.2255	32.691
12	5	0.1005	18.6833	18.156
24	5	0.1148	9.141	11.144
36	4	0.1436	5.7355	6.852
48	4	0.1644	3.6278	4.697
60	3	0.1842	2.6559	1.95
72	3	0.1923	1.3583	.847

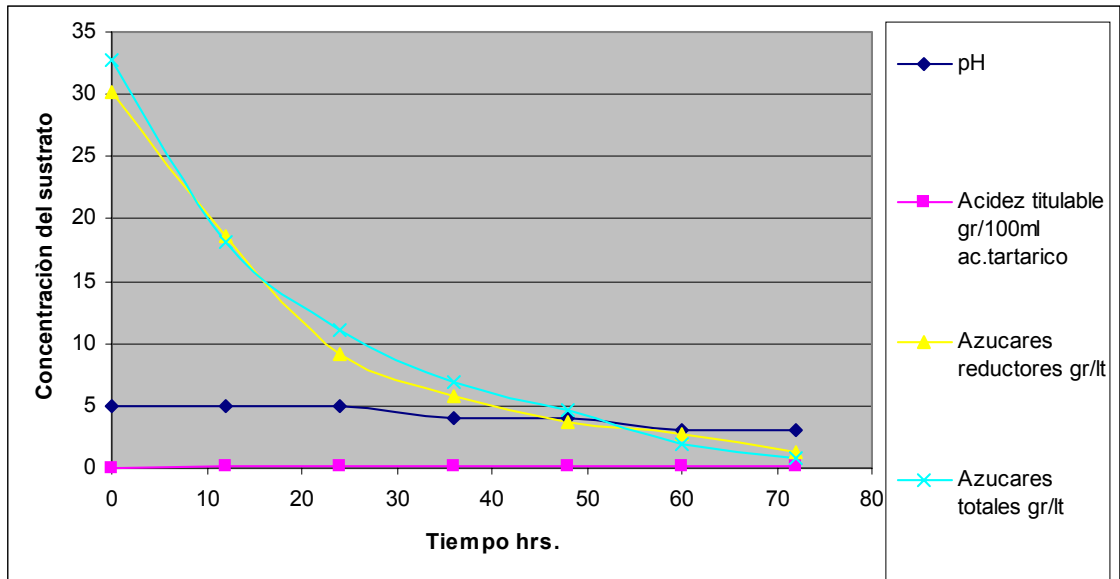


Fig. 49 Cinética de fermentación levadura amarilla cepa 1

El comportamiento de la levadura par a estos parámetros se comentan así. El pH se mantuvo estable en un valor de 5 alrededor de las 24 hrs., después empezó a bajar hasta 3 aproximadamente a las 60 h. En consecuencia la acidez aumentó su valor paralelamente a la disminución del pH

La cinética se inicio con una concentración de 30.2255 g/l de azúcares reductores los cuales fueron disminuyendo conforme la levadura los fue consumiendo. A las 72 hrs. de fermentación se agotó el sustrato, quedando un residuo de 1.3583 g/l azúcares reductores. La cantidad de azúcares totales en el medio fueron de 32.691 g/l a las 72 hrs. quedaban un residuo de .847 g/l.

Con los resultados mostrados en la tabla 9 de la levadura cremosa cepa 2 se trazo la cinética de la Fig.51

Tabla 9 Resultados de la levadura cremosa cepa 2

Tiempo	pH	Acidez titulable ac tartarico 100ml	Azucares reductores	Azucares totales
0	5	0.07184	26.0583	29.256
12	4	0.1149	16.0874	18.049
24	4	0.1436	9.517	9.464
36	3	0.1242	5.5074	4.697
48	2	0.2	3.4911	2.487
60	2	0.2015	2.0199	1.944
72	2	0.2231	1.2757	1.20

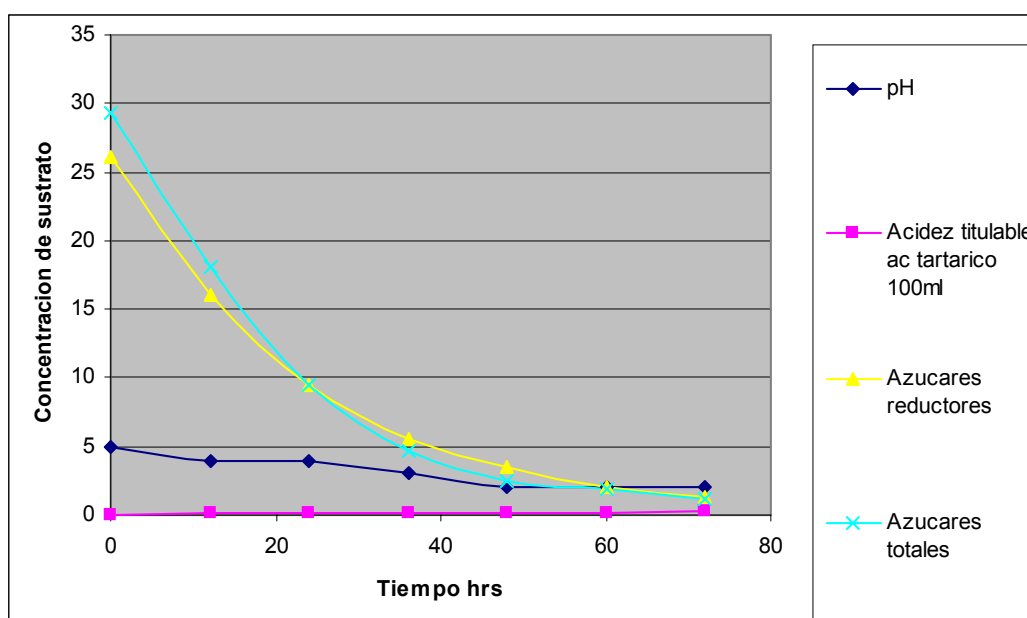


Fig. 50 Cinética de fermentación levadura cremosa cepa 2

El pH fue más variable con esta cepa. A las 12 hrs. disminuyó a un valor 4, terminando a las 72 hrs. en 2. De la misma forma el valor de la acidez fue mayor que en la cinética de la cepa 1.

La concentración inicial de azucares reductores en el medio fue de 26.0583 g/l y a las 72 hrs. se redujeron a 1.2757gr/l, consumiendo la cantidad de 24.7826gr/l de Los azucares totales presentes en el sustrato en el tiempo inicial fue de 29.256 g /l a las 72 hrs disminuyeron a 1.20 g/l, esta levadura

Con las cinéticas realizadas se logro visualizar los parámetros ya descritos y comportamiento de cada cepa de levadura.

5. CONCLUSIONES

En total se aislaron 3 cepas con características morfológicas diferentes las tres presentes en la elaboración de sotol en la región de Cedros Zacatecas. Se encontró mediante las pruebas fisiológicas y forma de reproducción que 2 de ellas cepa 1 levadura amarilla y cepa 2 levadura cremosa califican como *Saccharomices spp*, mientras que la levadura rugosa cepa 3 califica como *Hansenula*. Las levaduras aisladas pueden ser diferenciadas inequívocamente mediante la utilización de algún método descrito de Biología Molecular como por ejemplo la utilización de los cariotipos obtenidos por electroforesis en campo pulsante para futuros estudios

BIBLIOGRAFIA CITADA

Barnet J. A., Pankurst R. J. (1974) A New Key to The yeasts for identifying yeasts Based on Physiological tests only London American Elsevier Publishing Co., Inc-New York

Bureau, G., Brun, D., Vignes, A., Maujean, A., Vesselle, G. y Feuillat, M. (1982) Étude d'una microflore levurienne champenoise. Conn. Vigne Vin. Paris

Collado, (2001) Factores que afectan las fermentaciones disponible en internet.

Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1993) Yeast growth during fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology. (Ed. G.H. Fleet) Harwood Academic Publishers: Switzerland.

García Garibay, Mariano, Quintero Ramírez, López Murguía Canales (2004) Biotecnología Alimentaria 5ª edición editorial Limusa.

García, S.A.(1952). Comparación del sotol y la alfalfa en la alimentación de vacas lecheras. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Saltillo Coahuila México.

Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P. (1975) Sciences et Techniques du vin. Traité d'Oenologie II. Dunod: Paris.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol.

IMPI, 2002 Instituto Mexicano de la propiedad Industrial Denominación de origen para la Bebida alcohólica Sotol

Jørgensen Alfred, (1959) Microbiología de las Fermentaciones Industriales 7ª edición Editorial Acribia Zaragoza

Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984) The yeast, a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.

Lodder J. 1970. "The yeast A. Taxonomic Study" Amsterdam; North-Holland Publishing-Co.

NOM-159-SCFI-2004

Ough, C.S. y Amerine, M.A. (1987) Methods for analysis of must and wines. Wiley-Interscience Publication: California.

Pelczar Michael J., Jr Roger D. Reid (1965) Microbiology 2ª edición McGraw-Hill Kogakusha.

Phaff H.J., Miller M.V, and Mrak E. M.. (1978) “ The Life of Yeasts” Second Edition Revised and Enlarged, Harvard University Press Cambridge, Massachusetts and London, England.

Prescott Cate, Gordom Dunn Samuel (1962) Microbiología Industrial, 3ª edición Aguilar S. A. Madrid España.

Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol. J. Food Sci

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D. (1992b) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2948-2952.

Quesada, M.P. y Cenis, J.L. (1995) Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (2000) Handbook of Enology, Volumel: The Microbiology of Wine and Vinifications. Wiley & Sons Ltd. West Sussex: England

Sánchez, Marroquin Alfredo:(1961) Principios de microbiología industrial; 1ª edición Quimica S.A: Mex D:F.,

Suzzi, G., Romano, P., Sora, S.(1997) “Flocculation expression in a strain of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*”,Ann Microbiol Enzimol. Ltd. West Sussex: England

Varnam, Alan H. Sutherland P. Jane (1994) Bebidas Tecnología, Química y Microbiología, Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.

Xandri, Tagueña Salvat Jose Maria (1958) Elaboración de aguardientes simples compuestos y licores editores S.A.

