



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo A.C.**

**Parámetros de calidad, características sensoriales del
bacanora y selección de un cultivo iniciador para la
fermentación de azúcares de *Agave angustifolia* Haw.**

Por:

Maritza Lizeth Alvarez Ainza

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

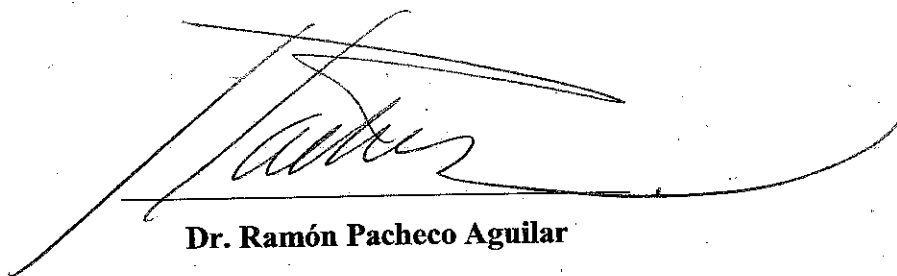
Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

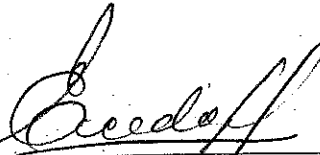


Dr. Ramón Pacheco Aguilar

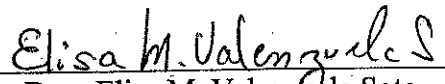
Director General

APROBACIÓN

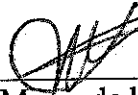
Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Maritza Lizeth Alvarez Ainza, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



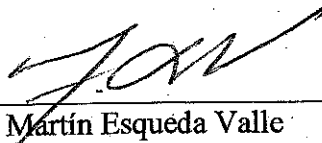
Dra. Evelia Acedo Félix
Director de Tesis



Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Asesor



Dra. Mayra de la Torre Martínez
Asesor



Dr. Martín Esqueda Valle
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por permitirme la vida y salud.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante el transcurso de este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación de Desarrollo, A.C. (CIAD) por aceptarme en el programa de Doctorado en Ciencias, así como, a la Coordinación de Programas Académicos (CPA), Dra. Ana María Calderón y ahora a Dra. Gloria Yépiz, y personal de docencia. De igual forma a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos.

A Fundación Produce Sonora A.C., por el apoyo al proyecto de “Selección de Levaduras” del cual forma parte esta tesis.

A todos los productores de Bacanora quienes nos apoyaron con muestras de bacanora, así como con materia prima.

A Casa Herradura por permitir realizar una estancia en sus instalaciones, en el área de Sensorial y Analítica. Aideé Orozco, Yoneko, Karina, Gaby y Elba.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por su apoyo en la realización de la primera parte del sensorial de consumidores.

Al Consejo Promotor de la Regulación del Bacanora por su apoyo al ofrecer sus instalaciones para culminar con el sensorial de consumidores.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Organismo Acuáticos (LBMOA) por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

Al la CTAOV por su apoyo al proporcionarnos el uso del congelador (diablo).

A Dra. Verónica Mata y M.C. Leticia Félix por facilitarnos sus equipos.

Al Laboratorio de Fisiología Microbiana y de Bioprocesos, por facilitarnos sus instalaciones, Dra. Mayra de la Torre, M.C. Ana Lilia López y M.C. Erika Acosta por su orientación en el uso del fermentador. A Jorge, Rosina y Adriana por la convivencia.

A la M.C. Luz del Carmen, Luis Robles, Yesica Martínez por proporcionarnos las facilidades del uso tanto del laboratorio como del cubículo de sensorial, así como su orientación en sensorial de consumidores.

A M.C. Javier Ojeda por apoyarnos en la recolección de las muestras de bacanora y por la convivencia.

Al Dr. Humberto González (Queche) por su apoyo en los análisis estadísticos realizados en éste trabajo.

A mi comité de tesis Dra. Mayra de la Torre, Dra. Elisa Valenzuela y Dr. Martín Esqueda por todas sus aportaciones a este trabajo, su revisión académica, en la escritura de esta tesis y durante los seminarios, muchas gracias.

A la Dra. Evelia Acedo mi directora de tesis por la confianza que deposito en mi al aceptarme como tesista de nueva cuenta, por la dirección realizada en este trabajo, y por todo su apoyo no solo académico, sino también personal, muchas gracias.

Al Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de los Alimentos (LACMA) por las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones, así como por la convivencia: Alejandra, Claudia Alfonso, Bethel, Isabel, Germán, y Noemí, Gracias.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular por la convivencia que de alguna manera hizo el trabajo más ameno: Iliana Guardiola, Rosalva J y Rosalva P.

A mis amigos por compartir momentos especiales, por su amistad y comprensión muchas gracias a Eva, Rocio, Reyna, Sorel, Alejandra, Rosalva J, Willy, Antonio y Alberto.

A José Luis quien me ha escuchado y apoyado el tiempo que tenemos juntos Gracias.

A toda mi familia quien me apoyó y ánimo en este periodo tan importante, por su paciencia y comprensión, especialmente a ti mamá que eres un gran soporte en la familia. Muchas gracias.

DEDICATORIAS

A Dios

A mi familia

A mis hermanos

A mis sobrinos

A mi hermoso hijo Julio David

Y en especial a mi mamá

Los quiero mucho!

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Sinopsis	3
Capítulo 1: Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora.	12
Capítulo 2: Quantification of major volatile compounds in artisanal bacanora.	19
Capítulo 3: Análisis sensorial y de compuestos minoritarios en destilados de <i>Agave angustifolia</i> Haw. (Bacanora).	35
Capítulo 4: Selection of native yeast for the bacanora production.	54

Nota de la numeración: los números arábigos en la tabla de contenido corresponden a los que se señalan en la parte inferior central en este manuscrito. Cada capítulo contiene una numeración diferente, la cual está sujeta al formato de envío que requiere la revista.

RESUMEN

El bacanora es una bebida regional y artesanal del Estado de Sonora. Con el reciente auge de bebidas destiladas de agave a nivel internacional, resulta importante conocer las características de calidad de esta bebida, así como determinar cuál es la participación de las cepas de levaduras nativas involucradas en el proceso de elaboración, objetivo planteado en este trabajo. Se analizaron 77 muestras donde el 55.8% de ellas cumplieron con las especificaciones de la norma oficial para bacanora, sin embargo se observa una alta variabilidad entre las muestras. Diecisiete muestras sobrepasaron los límites permitidos para alcoholes superiores, 11 para metanol, 8 para aldehídos y una para ésteres. Posteriormente un panel entrenado diferenció ocho perfiles diferentes de las 44 bebidas restantes (dentro de norma) y se describieron diversos atributos de olor, aroma, gusto y sensaciones trigeminales. Sólo el atributo de olor a humo mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$), relacionándose con la elaboración artesanal, muy rudimentaria. Algunos compuestos están correlacionados con los atributos descritos en este estudio por el panel entrenado, están asociados a la materia prima (olor y aroma a agave y a agave verde) y otros al proceso de fermentación (frutal, alcoholizado, etc.). El análisis con consumidores mostró que el perfil representado con la muestra 72 del municipio de Huépac fue preferida con un 41 % y se describió como una bebida suave, de buen olor, sabor y con cuerpo. Además se seleccionaron levaduras nativas, en base a características enológicas y de fermentación, aisladas de algunos municipios donde se produce bacanora. Se encontró que hay levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* adecuadas para éste proceso, por ejemplo que fermentan los carbohidratos presentes en el mosto y toleran etanol (20%). Las levaduras *S. cerevisiae* mostraron mayor adaptación al jugo de agave, además las cepas probadas resistieron las condiciones al final de la fermentación. Las levaduras no-*Saccharomyces* fueron menos tolerantes al medio de fermentación y solo la especie de *Torulaspora delbrueckii* logró adaptarse y sobrevivir al final de la fermentación.

Palabras clave: bacanora, volátiles mayoritarios, volátiles minoritarios, sensorial, levaduras.

ABSTRACT

Bacanora is a regional beverage elaborated in the Sonora, México. Due to the world wide boom of agave-distilled-beverages, it is important to characterize this drink as well as the native yeast involved in the fermentative process. 77 samples were analyzed, and 55.8 % of them met the specifications of the official standard for bacanora, however there is a high variability between samples. 17 samples exceeded the limits allowed for higher alcohols, 11 for methanol, 8 for aldehydes and one for esters. A trained panel distinguished eight different profiles on 44 samples, which meet the official standards, and described various attributes of odor, aroma, taste and trigeminal sensations. Only the smoke odor showed significant differences ($P \leq 0.05$), the odor come from the rudimentary production process. Some of the bacanora attributes described in this study by the trained panel are associated with the raw material (agave or green agave) and others to the fermentation process (fruity, alcoholized, etc.). Preference test showed that the sample 72 of the municipality of Huépac was the preferred by 41% of the consumers, and was described as a soft drink, with good smell and flavor, and body. Subsequently native yeasts isolated from some municipalities where the bacanora is produced, were selected due to its oenological and fermentation characteristics. the yeast were *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species with suitable characteristics for this process, for example, they ferment the carbohydrates in the must and tolerate 20% ethanol. In assessing the fermentation characteristics of yeast, *S. cerevisiae* showed better adaptation to the agave juice and withstand the strains tested at the end of fermentation. The non-*Saccharomyces* yeasts were less tolerant to the fermentation medium and just the strains of *Torulaspora delbrueckii* managed to adapt and survive the end of fermentation.

Key words: bacanora, major volatile, minor volatile, sensorial, yeast.

SINOPSIS

En México existen diferentes bebidas destiladas de agave, las cuales tienen actualmente un gran auge a nivel nacional e internacional, tales como tequila, mezcal, sotol y bacanora. La principal diferencia entre algunas de estas bebidas es el tipo de agave utilizado y en menor escala, el proceso de elaboración (Mancilla-Margalli y López, 2006; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

El bacanora es una bebida tradicional del Estado de Sonora, México, la cual se elabora de manera artesanal en el Área de Denominación Origen Bacanora (ADOB), que comprende 35 municipios, ubicados la mayoría en la sierra sonorense (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007, Alvarez-Ainza *et al.*, 2009). La elaboración de las bebidas a base de agave, comienza con la recolecta y jima de las piñas de agave silvestre, posteriormente se realiza una cocción de las piñas en hornos rústicos, generalmente bajo tierra. Una vez cocidas las piñas, éstas son molidas, desfibradas y sometidas a fermentación natural por la microbiota presente en los mostos durante varios días, tiempo que varía dependiendo de la región, temperatura y características del agua. Finalmente el mosto fermentado es destilado dos veces, y se obtiene un producto que contiene 38-55 % de alcohol v/v (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Alvarez-Ainza *et al.*, 2009, NOM-168-SCTI-2004).

En el proceso fermentativo se ha observado que el paso más crítico es el de la transformación de azúcares en etanol y otros subproductos, ya que en éste se van a formar la mayoría de los compuestos involucrados en el aroma y características típicas de la bebida. Estudios en diferentes bebidas principalmente en vino, han demostrado que el

utilizar cultivos iniciadores beneficia al proceso y al producto, ya que se asegura una buena fermentación y se obtienen lotes de productos más homogéneos (Esteve Zarzoso *et al.*, 2001; Wondra y Berovic, 2001; Mas *et al.*, 2002). Además la tendencia actual es el uso de cultivos iniciadores de levaduras nativas, tanto para vinos como para otras bebidas alcohólicas, ya que éstas están adaptadas a la materia prima y a las condiciones de fermentación, así como a las condiciones climáticas (Mas *et al.*, 2002; Querol *et al.*, 2003; Díaz-Montaña *et al.*, 2008; Arellano *et al.*, 2008).

En bebidas a base de agave, se ha encontrado varios compuestos involucrados en el aroma y sabor, tales como: alcoholes, ácidos grasos, ésteres, aldehídos, terpenos, fenoles, lactonas, compuestos azufrados, etc., en diferentes concentraciones (Vallejo-Córdoba *et al.*, 2004; de León-Rodríguez *et al.*, 2008). En bacanora existe una alta variabilidad en algunos componentes mayoritarios y a diferencia de otros destilados de agave, ésta variabilidad se atribuye principalmente al proceso artesanal de fabricación. Dentro de las bebidas mexicanas de agave el tequila es la que presenta menor variabilidad, seguramente por que el proceso de fabricación es controlado y tecnificado (Lachenmeire *et al.*, 2006; de León-Rodríguez *et al.*, 2008).

Todas las bebidas poseen un aroma primario, característico, el cual proviene de la materia prima utilizada, en el caso de las bebidas destiladas de agave, este aroma proviene del agave. El segundo aroma depende de la fermentación, la destilación y la maduración del producto. Las levaduras son las que determinan fundamentalmente esta característica, ya que son las que transformaran los azúcares presentes en los mostos a compuestos que formaran parte de la bebida (Peña-Álvarez *et al.*, 2004).

En bacanora no existen estudios sobre su composición o acerca de sus características sensoriales y de los compuestos responsables de las mismas, así como

tampoco sobre el uso de levaduras nativas como cultivos iniciadores, durante el proceso de fermentación. En la producción de bacanora, diversos productores se enfrentan a serios problemas y pérdidas económicas durante la producción, como: paradas de fermentación, bajos rendimientos de etanol (Comunicación personal), “avinagrado”, etc., lo cual está relacionado directamente con el proceso de elaboración, desde la selección de la planta, fermentación y destilación. Aunado al interés científico por conocer los parámetros de calidad y sensoriales del bacanora, así como de los microorganismos involucrados en la fermentación de los azúcares del *Agave angustifolia* Haw, del cual se produce el Bacanora, existe un interés particular en la industrialización de la bebida y la necesidad de mantener y asegurar la calidad homogénea del producto. Es por esto que en el presente trabajo se propuso la siguiente hipótesis:

Las levaduras nativas utilizadas como cultivos iniciadores incrementan la eficiencia del proceso de fermentación y el conocer la composición de la bebida y sus características sensoriales, ayudan a mejorar el proceso en otras etapas como la destilación y cocción.

Para demostrar lo anterior se planteó el objetivo general de analizar parámetros de calidad y características sensoriales de bacanoras que se elaboran actualmente en el ADOB y seleccionar un cultivo iniciador para la fermentación de los azúcares del *Agave angustifolia* Haw., en base a sus características fenotípicas y fermentativas. Con los objetivos específicos siguientes:

1. Determinar los parámetros de calidad de bacanoras obtenidos del ADOB, de acuerdo a la NOM, mediante cromatografía de gases (GC) y GC-Masas.
2. Determinar las características sensoriales del bacanora, mediante panel entrenado y consumidores.

3. Seleccionar cepas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* nativas presentes en la fermentación natural del bacanora en base a sus características fenotípicas.
4. Analizar las características fermentativas de las levaduras previamente seleccionadas en cultivos mixtos.

Este trabajo se dividió en varias etapas, las cuales están descritas en los cuatro capítulos que conforman esta tesis. En el capítulo 1: “Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora” (Alvarez-Ainza *et al.*, 2009), se desarrolla una revisión bibliográfica en donde se enfatiza la importancia de conocer las características de las bebidas y de evaluar las características de levaduras nativas para seleccionar aquellas que ayuden a mejorar la calidad y el rendimiento del producto. Esta revisión muestra como en diferentes estudios se demuestra que utilizar levaduras nativas con características adecuadas ayuda en la obtención de un producto homogéneo y de mejor calidad, lo cual nos da un panorama de los objetivos para este trabajo.

Así mismo, para cumplir con el objetivo específico número uno se llevó a cabo la cuantificación de compuestos mayoritarios en bacanoras elaborados de manera artesanal y estos resultados se presentan en el capítulo 2: “Quantification of major volatile compounds in artisanal bacanora”. Se muestran los resultados del análisis de volátiles mayoritarios cuantificados por cromatografía de gases, muchos de los cuales están regulados debido a la toxicidad que presentan y que pueden poner en riesgo la salud del consumidor. Este estudio mostró que los alcoholes superiores son los que presentan mayores concentraciones, superando a las especificadas en la norma oficial para bacanora.

Por otra parte se llevó a cabo un “Análisis sensorial y de compuestos minoritarios en destilados de *Agave angustifolia* Haw. (Bacanora)” descrito en el capítulo 3 y con éste

análisis se cumple con el objetivo número dos planteado en este trabajo. Éste trabajo muestra el primer análisis sensorial con panel entrenado que describe la bebida bacanora, así como la preferencia del consumidor por esta bebida. Se reportan los atributos de importancia en esta bebida, así como ocho perfiles de bacanora diferentes, donde el único atributo que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles fue el olor a humo. También en éste estudio se correlacionaron los atributos descritos por los jueces con algunos compuestos minoritarios.

Finalmente los objetivos específicos tres y cuatro se desarrollan en el capítulo 4: “Selection of native yeast for the bacanora production”. En este capítulo se describe un análisis de las características fenotípicas de una colección de levaduras nativas (colección del Laboratorio de Microbiología, CIAD), que fueron aisladas durante la fermentación alcohólica en la producción de bacanora. Se observó que hay levaduras del tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* adecuadas tomando en cuenta algunos criterios establecidos de acuerdo a la revisión hecha en el capítulo 1. Al evaluar las características fermentativas, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* mostraron mayor adaptación al jugo de agave y las cepas probadas se mantuvieron viables hasta el final de la fermentación. Las especies de levaduras no-*Saccharomyces* fueron menos tolerantes al mosto y al medio de fermentación y solo la especie de *Torulaspota delbrueckii* logró adaptarse y sobrevivir hasta el final de la fermentación.

Con los resultados generados en este trabajo, se comprobó que el utilizar levaduras como cultivo iniciador hace más eficiente el proceso fermentativo. El conocer la composición sensorial e identificar los volátiles contenidos en el bacanora nos orienta a modificar otros puntos del proceso como son la cocción, que de acuerdo los datos obtenidos, ésta tiene un gran impacto en el aroma de bacanora.

Así mismo, también se puede modificar el proceso de destilación, ya que se observó que casi la mitad de las muestras están fuera de norma, la mayoría por presentar altas concentraciones de alcoholes superiores, esto puede ser corregido eliminando una mayor proporción de “colas” durante la destilación.

Además, con los resultados obtenidos se abren nuevas líneas de investigación con los cultivos iniciadores y la evaluación de los compuestos volátiles producidos por los mismos. Así como, la necesidad de investigar la composición o identidad de los compuestos minoritarios, para establecer cuales son los compuestos que le dan sus características organolépticas especiales y la huella a los productos.

BIBLIOGRAFÍA CITADA EN SINOPSIS:

- Alvarez-Ainza M L, K A Zamora-Quiñonez, E Acedo-Félix (2009) Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. Revista Latinoamericana de Microbiología 51:58-63.
- Arellano M, C Pelayo, J Ramírez, I Rodríguez (2008) Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from agave juice. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35:835-841.
- De León-Rodríguez A, Escalante-Minakata P, Jiménez-García M I, Ordoñez-Acevedo L G, Flores-Flores J L, Barba de la Rosa A P (2008) Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. Journal Food Technology and Biotechnology 46(4):448-455.
- Díaz-Montaña D L, M Délia, M Estarrón-Espinoza, P Strehaiano (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. Enzyme and Microbial Technology 42:608-616.
- Esteve-Zarzoso B, M Perri-Torán, E García-Maiquez, F Uruburu, A Querol (2001) Yeast populations dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. Applied Environmental and Microbiology 67(5):2056-2061.
- Gutiérrez-Coronado M L, E Acedo-Félix, A Valenzuela-Quintanar (2007) Industria del Bacanora y su proceso de Elaboración. Ciencia y Tecnología Alimentaria 5(5):394-404.

- Lachenmeier D, E Sohnius, R Attin, M López (2006) Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3911-3915.
- Lappe-Oliveras P, R Moreno-Terrazas, J Arrizón-Gaviño, T Herrera-Suárez (2008) Yeast associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverage. *FEMS Yeast Research* 8:1037-1052.
- Mancila-Margalli N, M G López (2002) Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. Azúl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:806-812.
- Mas A, M Torija, G Beltrán, M Novo, N Hierro, M Poblet, N Rozés, J Guillamón (2002) Selección de levaduras. *Tecnología del vino, Fermentos*. 39-44.
<http://www.alcion.es>
- NOM-168-SCTI-2004 (2005) Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Bacanora-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. Diario oficial de la Federación. www.org.mx.
- Peña-Álvarez A, L Díaz, A Medina, C Labastida, S Capella, L E Vera (2004) Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1027:131-136.
- Querol A, M Fernandez-Espinar, M del Olmo, E Barrio (2003) Adaptative evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology* 86:3-10.

Vallejo-Córdoba B, A Gonzalez-Córdoba, M C Estrada-Montoya (2005) Latest advantages in the characterization of Mexican distilled agave beverage: tequila, mezcal and bacanora. AGFD-113 229th ACs meeting, San Diego, CA.

Wondra M, M Berovic (2001) Analyses of aroma components of chardonnay wine fermentation y different yeast strains. Food Technology and Biotechnology 39(2):141-148.

CAPÍTULO 1

Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora

**Maritza Lizeth Alvarez-Ainza¹, Karina Alejandra Zamora-Quiñonez¹ y Evelia
Acedo-Félix¹**

¹Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Tel.
y Fax. 01 (662) 289 24 00 Ext. 224 y 267.

Publicado en:

Revista latinoamericana de Microbiología 51:58-63.

Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora

Maritza Lizeth Álvarez-Ainza,* Karina Alejandra Zamora-Quiñonez,* Evelia Acedo-Félix*

RESUMEN. El bacanora es una bebida regional elaborada en el Estado de Sonora, México de manera artesanal a partir de *Agave angustifolia* Haw, sus cabezas son cocidas, molidas y después sometidas a fermentación alcohólica, de manera natural, para finalmente realizarse una doble destilación y obtener un producto con un contenido de alcohol que oscila entre 40 y 55 °GL. Se revisaron investigaciones de bebidas alcohólicas fermentadas, como vino, tequila y mezcal. De acuerdo a las conclusiones de los autores, es de importancia conocer los compuestos volátiles que constituyen una bebida, para seleccionar aquellas levaduras que mantengan su identidad. Los resultados mostrados por la investigación con levaduras autóctonas seleccionadas de vino, fundamentan la recomendación para escoger levaduras para la producción de el bacanora, pues esto permitirá una mejor calidad y homogeneidad de la bebida.

Palabras clave: Bacanora, levaduras, fermentación alcohólica.

ABSTRACT. Bacanora is a typical Mexican alcoholic beverage manufactured in Sonora State by artisan process, obtained from *Agave angustifolia* Haw. The heads of agave are cooking, ground, and fermented by natural fermentation and finally the fermented juice of agave is distilled to obtain a product with 45-50° GL of alcohol contain. Some investigations related to alcoholic beverages like wines, tequila and mezcal were analyzed. Authors conclude that is very important know the volatile compounds to make a selection of wild yeast that support the identity of each beverage. The studies using local yeast selected in wine are really spirited to use this yeast in the manufacture of bacanora, witch can be used to obtain a better quality and homogeneity of the beverages.

Key words: Bacanora, yeast, alcoholic fermentation.

INTRODUCCIÓN

El bacanora, se define como: «bebida alcohólica regional del Estado de Sonora, México, obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de la molienda de las cabezas de *Agave angustifolia* Haw, hidrolizadas por cocimiento y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras. El bacanora es un líquido que según su tipo es incoloro o amarillento, cuando es madurado en recipientes de madera de roble o encino, o cuando se aboque sin maduración», según la Norma Oficial Mexicana publicada en el año 2005. Actualmente, el proceso de fermentación de el bacanora se realiza de manera natural, donde los productores no agregan inóculo de levadura. Estudios en diversas bebidas enfocados principalmente a la fermentación, proporcionan una abundancia de conocimientos del proceso de elaboración. El vino es una de las bebidas más estudiadas, donde se ha determinado que contiene una amplia diversidad de compuestos, la mayoría de los cuales son producidos por las levaduras existentes en

los mostos; las más abundantes son las levaduras nativas, las que dan sus propiedades organolépticas a los distintos vinos aun cuando se utilice un inóculo microbiano específico (Esteve-Zarzo et al, 2001; Querol et al, 2003; NOM-168-SCFI-2004). El resultado de estos trabajos fundamenta la recomendación para seleccionar levaduras nativas para la producción de bacanora, como se hace con otras bebidas, lo que permitiría alcanzar una mejor calidad y homogeneidad en el producto final.

BACANORA

Proceso de elaboración de bacanora

El bacanora ha sido elaborado desde hace más de 300 años de manera artesanal. Es uno de los destilados de agave importantes de México. Actualmente la zona tradicional de producción de bacanora incluye 35 municipios situados dentro del Área de la Denominación de Origen Bacanora (ADOB), que comprende: Bacanora, Sahuaripa, Arivechi, Soyopa, San Javier, Cumpas, Moctezuma, San Pedro de la Cueva, Tepache, Divisaderos, Granados, Huásabas, Villa Hidalgo, Bacadéhua-chi, Nácori Chico, Huachineras, Villa Pesqueira, Aconchi, San Felipe de Jesús, Huépac, Banámichi, Rayón, Baviácora, Opodepe, Arizpe, Rosario, Quiriego, Suaqui Grande, Ónavas, Yécora, Álamos, San Miguel de Horcasitas, Ures, Mazatán y La Colorada (Moreno 1998; Núñez, 2001; Yáñez, 2003; de la Cruz, 2003; NOM-168-SCFI-2004).

La elaboración de el bacanora tradicional o artesanal se realiza con agave silvestre por cocción o «tatemala» de la piña de agave en hornos subterráneos rudimentarios, recubiertos con piedra volcánica, que son cubiertos con lámina de metal y tierra para evitar la salida de calor, para hidrolizar los carbohidratos de reserva que contiene la piña: los fructanos como los fructooligosacáridos y la inulina, que su mayor parte se convierte en fructosa (97%) y en menor proporción en glucosa (3%), según la estructura de inulina contenida en alta concentración en *A.e angustifolia* (García et al, 2007). Seguida de una molienda con hacha, mazos o palos de madera, y posteriormente la fermentación en barriles rudimentarios con capacidad de 200 litros, o bien, en barrancas: hoyos subterráneos, recubiertos de cemento rústico, donde se deja reposar por 7 o más días, según la temperatura ambiental. Al fermento se le realiza una primera destilación o desflemado, en barriles metálicos, calentados con leña de mezquite, para lo que se utiliza un sombrero y serpentina de cobre, rudimentarios. Una vez que se hierve el barril se cubre y se sella con lodo, para evitar fuga de vapores; al terminar se desecha el bagazo y el producto se somete a una segunda destilación, de la que se obtienen tres porciones: cabezas, medios y colas, las que al mezclarse generan un producto con un contenido de alcohol que oscila entre los 35° y los 55° Gay Lussac (GL) (Núñez, 2001).

La principal diferencia que existe entre las bebidas destiladas de agave mexicanas como el tequila, mezcal, sotol y bacanora es que provienen de diversas especies de agaves; todas se elaboran o se realizan alguna vez de manera artesanal. En el tequila para su elaboración se usan herramientas más sofisticadas y mayor cantidad de materia prima, para alcanzar una calidad uniforme de la bebida, donde las diferentes etapas están determinadas por las características específicas de cada una, como en la fermentación, que es de suma importancia, donde se vigilan con detalle la concentración de los componentes y el inóculo de levaduras; en cambio, en el bacanora todo se hace empíricamente a cálculo del vinatero (Bautista-Justo, 2001).

LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares microscópicos sencillos que se reproducen por gemación o fisión; este grupo comprende 46 géneros y alrededor de 462 especies (TOWMSG, 2007). Son microorganismos cosmopolitas conocidos como los agentes de la fermentación. Antes se creía que sólo *Saccharomyces cerevisiae* participaba en la fermentación y producción de bebidas alcohólicas. Actualmente se sabe que los diferentes géneros de levaduras no *Saccharomyces* participan en el proceso, principalmente en su inicio, lo que influye en las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas (Bourgeois y Larpent, 1995; Fra-

zier y Weathoff, 1998). Las levaduras tienen necesidades en lo que se refiere a nutrición y temperatura, nutrición del ambiente en que viven, tienen ciclos reproductivos cortos, lo que hace que el inicio de la fermentación sea rápida, pero así como se multiplican mueren fácilmente por la carencia de alguna de sus necesidades fisiológicas vitales (Querol et al, 1992a; Querol et al, 1992b; Steinkraus, 1997).

El metabolismo fermentativo de las levaduras de manera habitual genera alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos, ésteres y compuestos azufrados e incluso fenólicos y algunos forman terpenos. Su fisiología obviamente está condicionada por factores fisicoquímicos durante la fermentación, dependiente de sus propiedades genéticas. Estos compuestos aparecen principalmente como metabolitos secundarios durante la fermentación glicerol-pirúvica, particularmente los alcoholes, ésteres y ácidos volátiles. Diversos estudios en vino, cerveza, whisky, coñac y ron sugieren que las diferencias en los componentes del sabor se atribuyen a la actividad biológica de los diferentes géneros y cepas de levaduras usadas en los respectivos tipos de fermentación (Suárez, 2002; Fachine et al, 2005).

Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es uno de los procesos más importante para la síntesis de los compuestos de aroma. Bioquímicamente es compleja para convertir azúcares fermentables en energía, en etanol y CO₂ por la vía metabólica conocida como Embden-Meyerhof. La fermentación alcohólica es la base de la vinificación, sin embargo, su importancia no radica únicamente en la generación de etanol a partir de los azúcares, sino que durante la fermentación se forman una amplia diversidad de metabolitos secundarios que influyen en la calidad y tipo de cada bebida alcohólica (Esteve-Zarzoso et al, 1999; Mathews y van Holde, 2000; Wondra y Berovic, 2001; Combina et al, 2003; Querol et al, 2003; Romano et al, 2003).

En el vino se reporta que la mayoría de los aldehídos son sintetizados en la primera fase por oxigenación y una extendida prefermentación. En esta etapa el acetaldehído es producido como consecuencia de la ausencia de la enzima alcohol deshidrogenasa en las levaduras, que reducen el acetaldehído en etanol. Los acetales, así como varias cetonas, dicetonas e hidroxicetonas son sintetizadas de este acetaldehído. La segunda etapa es empleada para generar acetales y cetales; en esta fase se intensifica la temperatura y la acidez. En los vinos, los alcoholes superiores se forman de la transaminación de aminoácidos, descarboxilación y reducción particularmente de los cetoácidos, por la ruta del metabolismo de Ehrlich. Los alcoholes superiores son cuantitativamente la mayoría de las sustancias aromáticas en el vino. Como parte de la calidad del vino existe también

un alto número de ácidos grasos esterificados, de la primera fase de la fermentación (Wondra y Berovic, 2001).

Las fermentaciones alcohólicas espontáneas involucran en su primera etapa la producción de los compuestos de aroma, por los denominados géneros de levaduras no-*Saccharomyces* como lo son *Kloeckera* spp, *Hanseniospora* spp, *Candida* spp, *Pichia* spp, *Zygosaccharomyces* spp, *Shizosaccharomyces* spp, *Torulaspora* spp, *Hansenula* spp y *Metschnikowia* spp. Estos géneros y especies se reportan como productoras de importantes cantidades de algunos compuestos, con efecto en la calidad sensorial de vinos. Estas levaduras crecen durante los primeros días (4-6), después mueren por su intolerancia a las altas concentraciones de etanol por arriba del 6%. Sin embargo, los géneros y cepas de no-*Saccharomyces* generan sabores deseables e indeseables en el mosto fermentado. *Hansianospora* spp y *Pichia* spp, promueven la esterificación de varios alcoholes como etanol, geraniol, alcohol isoamilico y 2-feniletanol, incrementan así los ésteres con aroma a fruta; estas cepas y géneros silvestres son más útiles en la síntesis de compuestos volátiles. Un estudio realizado por Migorance-Cazorla et al (2003) observaron que una cepa de *P. fermentans* incrementó la concentración de alcoholes superiores y acetato de etilo, lo que le dio al vino una mayor calidad sensorial en comparación con cepas no-*Saccharomyces* evaluadas.

En la mayoría de las bebidas alcohólicas, los compuestos responsables del olor y el sabor son los volátiles. En los vinos los alcoholes y los ésteres son cualitativamente los más importantes, sin embargo su impacto en el aroma no es el mismo. Los alcoholes son compuestos que individualmente no tienen un olor marcado, pero cuando están diluidos refuerzan el aroma. Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal de vinos jóvenes, en especial los ésteres de ácidos grasos de cadena corta. La capacidad de generar alcoholes superiores es una propiedad de todas las levaduras, pero la cantidad varía en función del género, de la especie y de la cepa. Como se ha mencionado, existen numerosas investigaciones sobre vino donde se han detectado más de 650 compuestos y la mayor parte de los cuales se genera en la fermentación (Suárez, 2002).

Bioquímica de la fermentación alcohólica

Se ha visto que una etapa clave en la fermentación por las levaduras es el transporte de los azúcares, ya que su concentración interna se mantiene baja comparada con la externa, lo que limita la fermentación. Esto se ha reportado en estudios de la producción de vinos, particularmente con *S. cerevisiae*, donde se inhibe el transporte de los azúcares; en consecuencia, espontáneamente se interrumpe la fermentación; dada la importancia del proceso, se han realizado investigaciones para entender el mecanismo de transporte.

Se ha demostrado la existencia de genes que codifican para la síntesis de proteínas transportadoras en *S. cerevisiae*: 20 genes principalmente de transportadores de glucosa y fructosa. Estos transportadores tienen diferente afinidad por los azúcares, que hace que el transporte sea variable. En otros géneros y especies de levaduras se han encontrado transportadores parecidos a los de *S. cerevisiae* y otros específicos. Posterior al transporte de los azúcares sencillos fermentables, se realiza la glucólisis, la que es catalizada por la acción consecutiva de 10 enzimas que permiten obtener piruvato a partir de glucosa o fructosa. Posteriormente, el piruvato es convertido a etanol a través de la fermentación alcohólica, una reacción con un solo intermediario, el acetaldehído, el que es convertido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). En *Saccharomyces* se conocen 4 deshidrogenasas dependientes de NAD o NADP :ADH I, ADH II, ADH III y ADH IV, las primeras dos son constitutivas, la ADH I transforma el acetaldehído a alcohol y la ADH II realiza la reacción inversa, la función de las demás no está bien definida (Mathews y Van Holde, 2000; Gschaelder et al, 2004).

Entre los compuestos que se forman están las grandes familias de alcoholes superiores, carbonilos como los aldehídos, los ésteres, los ácidos orgánicos, las grasas y los compuestos con azufre. Es importante comentar que los géneros de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* involucradas en la fermentación, tienen metabolismo semejante y generan los mismos compuestos, pero la capacidad de sintetizar cada uno de éstos está más desarrollada en algunos géneros y especies que en otros. Los alcoholes superiores son aquellos con más de dos átomos de carbono, y excluyen entonces al metanol y el etanol. Las levaduras sintetizan estos alcoholes por la descarboxilación de los cetoácidos, seguida de una reducción del aldehído al alcohol correspondiente. Los cetoácidos se sintetizan por dos vías: catabólica, a partir de los aminoácidos, o anabólica, a partir de los azúcares del ambiente; ambas vías actúan simultáneamente durante la fermentación. La contribución relativa de cada vía depende del nivel y la composición de nitrógeno asimilable, así como de la oxigenación, la temperatura, y de la concentración de ácidos grasos y ácido pantoténico. Los principales alcoholes superiores son: el isobutanol, 3-metil-butanol, 2-feniletanol e isobutanol. Los aldehídos se forman principalmente durante la fase fermentativa por la descarboxilación de cetoácidos; destacan el acetaldehído relacionado con la actividad de la piruvato descarboxilasa, dependiente de la levadura, y de los nutrientes, ya que su falta de viabilidad, provoca la acumulación de aldehídos, porque la fermentación queda incompleta y se detiene a nivel de aldehído. Las cetonas generalmente se forman del catabolismo de aminoácidos que depende de las levaduras; en bebidas, las cetonas son en su mayoría dicetona, se sintetizan por descarboxilación oxida-

tiva de ácidos acetohidroxidos que excretan las levaduras. La mayor cetona en bebidas alcohólicas es la diacetil, que se forma a partir del acetolactato, generado por el metabolismo de dos aminoácidos: la valina y la leucina. Las levaduras no generan acetales: se sintetizan a partir de los aldehídos, los cuales son reactivos, y de los alcoholes, que se liberan de dos moléculas de alcohol y un aldehído. Los ésteres se sintetizan a partir de un alcohol y un ácido (orgánico o graso); cuando éstos reaccionan el proceso es lento y reversible; son producidos por las levaduras mediante la esterificación enzimática entre los alcoholes libres y los ácidos carboxílicos en forma activa como la acil-CoA; el más abundante es el acetato de etilo. Los ácidos orgánicos derivan del metabolismo intermediario, de la vía del ácido pirúvico: acetato, malato, succinato y citrato; otros provienen del metabolismo de los ácidos grasos, en particular el malonil-CoA y su acumulación depende de la rapidez de la fermentación. Los compuestos azufrados no son sintetizados por las levaduras, algunos derivan de aminoácidos como la cisteína y la metionina; los principales son el dióxido de azufre y sulfuro de hidrógeno (Mathews y Van Holde, 2000; Gschaedler et al, 2004).

PARTICIPACIÓN DE LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN DE DIFERENTES BEBIDAS

En algunos estudios se reporta que para que una fermentación tenga éxito son indispensables materias primas de alta calidad, que proporcionen a las levaduras los nutrientes necesarios para su crecimiento óptimo. En la industria tequilera se paga menos dinero a los vendedores de piñas de agave cuando están inmaduras o su contenido de azúcares no es el adecuado. En el agave azul se sabe que contiene principalmente agua: 60%, inulina: 24%, fibras: 11%, azúcares reductores: 1.5%, proteínas: 0.02% y cenizas: 2.7% (Lanchenmeier et al, 2006; CIATEJ, 2004; Bautista-Justo, 2001; Muñoz et al, 2005). Recientemente, con el trabajo de Moreno (2006) se reportó que *A. angustifolia* contiene 42.43% de azúcares reductores totales, que incluyen la inulina; y los azúcares reductores no provenientes de la inulina, con estos datos se podría pensar que se tendrían mayores rendimientos/kilo de cabezas de *A. angustifolia* que con el agave azul, por lo que habría que analizar a detalle estos datos para optimizar al máximo la producción de bacanora, lo que actualmente no ocurre. Los reportes de diversos resultados del análisis en la fermentación de vino y en el aguardiente han sido de un valor, ya que bebidas alcohólicas son similares y lo que cambia es la fuente de azúcares fermentable; en el proceso, la etapa más importante en la elaboración de cualquier bebida, es el papel de las levaduras, pues son las responsables de la síntesis de la mayor parte de los compuestos que les dan las propiedades únicas a cada

bebida; el bouquet (Fleet et al, 1984; Pataro et al, 2000). En vinos se reporta que al incorporar sulfato antes de iniciar la fermentación se inhibe la diversidad bacteriana, y si se usan cultivos iniciadores también se impide el crecimiento de las levaduras nativas, lo que ayuda a la implantación de la que se desea, se conduzca la fermentación, así como la incorporación de compuestos con nitrógeno en cierta etapa del proceso, lo que evita que la fermentación se detenga y que el metabolismo de la levadura sea la síntesis de metabolitos secundarios, que formen compuestos de sabor y aroma (Arrizón y Gschaedler, 2002; Táboas et al, 2002; Gschaedler et al, 2004).

El uso de levaduras comerciales durante la fermentación es efectiva para los productores de vino, lo que les ha ayudado a homogeneizar la calidad de los vinos en las diferentes vendimias. La mayoría de los géneros de cepas de levaduras empleadas industrialmente pertenecen al género *Saccharomyces* y la especie común es *S. cerevisiae*, ya que posee un alto potencial fermentativo en diferentes ambientes. Según Querol et al, (2003) se adapta fácilmente a distintas actividades a las que se somete en la domesticación; según estos autores, *S. cerevisiae* posee un alto polimorfismo en sus cromosomas provenientes de vinaterías españolas.

En numerosos países se utilizan levaduras comerciales en la elaboración de bebidas con excelentes resultados, con productos de buena calidad y uniformes, en comparación con las bebidas de fermentación natural. Sin embargo, en vinos se reporta que el uso de alguna levadura comercial no garantiza que sea la única que realiza la fermentación, pero sí ayuda a la implantación de las levaduras al inicio del proceso, porque inhiben la actividad de bacterias contaminantes; por lo anterior, es más efectivo emplear cultivos puros de levaduras que procedan de una zona vitivinícola específica e incluso de la misma vinatería donde se pretenden colocar, conocidas como levaduras locales seleccionadas (Mas et al, 2002); éstas son nativas del área, están adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima, y son responsables, al menos parcialmente, de las propiedades únicas de la bebida alcohólica.

Para seleccionar levaduras nativas de una zona, el primer paso es conocer la microbiota autóctona del área y/o vinatería, donde se confirme que son cepas de *S. cerevisiae* que dominen en las fermentaciones alcohólicas; de ahí se preseleccionan aquellas que intervengan en la mayor parte de la fermentación, principalmente al final y que cumplan con las características enológicas deseadas según la clase de bebida. Por lo tanto, la selección de la cepa adecuada para cada tipo de fermentación es una estrategia importante para garantizar una fermentación correcta, así como para mejorar las propiedades deseables del producto final, ya que los diferentes géneros de levaduras forman compuestos que dan un toque de distinción a la bebida, ya sea por los tipos

y concentración de compuestos que contienen tales como: alcoholes superiores, ésteres, glicerol, etc. (Esteve-Zazorso et al, 2001; Mas et al, 2002; Querol et al, 2003).

Wondra y Berovic et al, (2001), reportaron que diferentes cepas de *S. cerevisiae* generan los mismos compuestos: 14 alcoholes superiores, 4 ácidos grasos de alto peso molecular y 14 ésteres; sin embargo, a concentración variable, de 29 cepas de *S. cerevisiae* evaluadas, una produjo un vino excelente y 10 cepas sólo vinos buenos. En bebidas destiladas tres alcoholes superiores: el 2-metilpropanol, 2-metilbutanol y 3-metilbutanol juegan un papel importante por su olor penetrante, que se detecta fácilmente. Been y Peppard (1996) detectaron en tequila 22 alcoholes superiores diferentes; respecto a su concentración, los más importantes, fueron los alcoholes isoamílicos: 2 y 3 metilbutanol; el propanol el metilpropanol, el isopropanol y el butanol; también encontraron 8 aldehídos; destacó: el acetaldehído y 47 ésteres, predominando el acetato de etilo. Ledauphin et al, (2004) en un estudio con 331, identificaron estos compuestos en calvados y coñac; de esos 331, 162 se consideraron como trazas, de los que 39 fueron comunes para ambas bebidas, 30 fueron específicos del coñac y sólo 93 se encontraron en los calvados. León Rodríguez et al, (2006) analizaron varios tipos de mezcales elaborados a partir de *A. salmiana*, donde se identificaron 37 compuestos, 9 se clasificaron como los más comunes, ahí incluyeron los alcoholes saturados, acetato de etilo, etil-2-hidroxipropionato y ácido acético; estos compuestos existen también en tequila y otras bebidas alcohólicas, sin embargo el mezcal contiene compuestos únicos como: el limoneno y el pentilbutanoato, utilizados para la autenticación de esta bebida, producida únicamente con *A. salmiana*. Lachenmeier et al, (2006) evaluaron algunos compuestos volátiles de diversas bebidas destiladas de agave mexicana tequila, mezcal, sotol y bacanora y concluyen que las bebidas varían en un amplio rango en su composición. Donde el tequila muestra diferencias en la concentración de: metanol, 2,3-metil-1-butanol y 2-pentiletanol pero con baja cantidad en los tequilas que no son 100% agave; el mezcal no mostró diferencias entre los parámetros evaluados, mientras que el sotol contiene alta concentración de nitrato y baja de 2,3-metil-1-butanol el bacanora se caracterizó por una elevada concentración de acetaldehído y baja de lactato de etilo. Según estos mismos autores, se reportan marcadas diferencias genéticas en los géneros de levaduras aisladas de bebidas de agave mexicana; en el tequila que regularmente se elabora industrialmente se usan cepas de levaduras, que son importantes porque tienen influencia en la concentración de alcoholes superiores generados con el etanol. Se ha reportado que las cepas nativas de levaduras aisladas de tequila producen elevada concentración de compuestos como alcohol isoamílico e isobutanol comparada con los géneros de levaduras de panadería.

Molina-Guerrero et al, (2007), identificaron 85 compuestos en mezcal, de los cuales 30 se reportan como constituyentes en otras bebidas alcohólicas. De estos compuestos, el 76% coincide con los encontrados en el tequila. Según Been y Peppard (1996), en el tequila los compuestos más abundantes que se detectan son los alcoholes; sin embargo, en el trabajo de Molina-Guerrero et al, (2007) se reporta mayor concentración de ésteres, ácidos orgánicos y acetales, así como una amplia variabilidad en la composición química, lo que significa que el mezcal es una bebida con rasgos característicos de las distintas especies de agave y de los procesos tradicionales locales empleados en su elaboración. En el trabajo de Romano et al, (1998) se sugiere una selección de levaduras, en base a la generación de metabolitos secundarios y la estabilidad que tienen en las diferentes etapas de fermentación en la producción de vinos.

La alta variabilidad de las bebidas de agave tiene que ver con la variedad empleada en su fabricación; por ejemplo en el mezcal usan distintas clases de agave porque existe tanta diversidad entre los tipos de mezcal; además la elaboración es artesanal, como en el sotol y el bacanora, lo que posiblemente no sucede con las que provienen de un sola clase de agave. En el tequila y algunos tipos de mezcal se usan levaduras comerciales sin seleccionar de alguna destilería, puesto que con levaduras nativas seleccionadas podría mejorarse la producción y la calidad de estas bebidas. En el de bacanora, los productores no inoculan para su elaboración artesanal ningún tipo de levadura. Actualmente no existen trabajos publicados sobre los géneros de levaduras involucradas en la elaboración de el bacanora, sin embargo, en el laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., se evalúa la participación de cepas nativas durante la fermentación de el bacanora.

CONCLUSIÓN

El estado del arte de la literatura revisada muestra que recientemente se ha incrementado el uso de levaduras nativas seleccionadas para la elaboración industrial de vinos, lo que es de vital importancia para conocer los compuestos volátiles que constituyen una bebida, y seleccionar aquellas levaduras que mantengan la identidad de la bebida. Las investigaciones realizadas con esas levaduras en el vino, son realmente alentadoras para la selección de levaduras nativas, que sean empleadas en la elaboración de bebidas alcohólicas, para alcanzar su mejor calidad y homogeneidad. En el bacanora con su reciente auge y tendencia a la industrialización, el utilizar levaduras locales seleccionadas estimulará una mayor eficiencia en la etapa de fermentación y un producto de buena calidad.

REFERENCIAS

1. Arrizon J. y Gschaedler A. 2002. Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing and additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can J Microbiol* 48: 965-970.
2. Bautista-Justo, M., García-Oropeza L., Barboza-Corona J. E. y Parra-Negrete L. A. 2001. El agave tequilana Weber y la producción de tequila. Universidad de Guanajuato. Acta Universitaria, 11: 26-34.
3. Bourgeois, C. y Larpent, J. 1995. Microbiología Alimentaria. Vol. 2 Fermentaciones Alimentarias. España. Ed. Acibia, S. A., pp. 19-33.
4. Been, M. y Peppard, L. T. 1996. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J Agric Food Chem* 44: 557-566.
5. García, P., Guzmán V. y López M. 2007. Fructanos del agave. La tecnología, del campo de experimentación a la parcela del productor. Ed. Agroproduce, pp. 20-22.
6. Gschaedler, M., Ramírez, C., Díaz, M., Herrera, L., Arellano, P. Arrizón G. y Pinal Z. 2004. Fermentación etapa clave en la elaboración de tequila, capítulo 4. En *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. En: Gschaedler MAC (ed) Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco, México pp. 62-120.
7. Combina, M., Elia A., Mercado L., Catania C., Ganga A. y Martínez C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* 99: 237-243.
8. De la Cruz, C. 2003. Sembrar maguey y producir Bacanora en el rancho. PATROCIPES. *Rev Rancho* 11: 22-23.
9. De León-Rodríguez A., González-Hernández L., Barba de la Rosa A. P., Escalante-Minakata P. y López M. G. 2006. Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave Salmitana*. *J Agric Food Chem* 54: 1337-1341.
10. Esteve-Zaroso, B., Peris-Torán M., García-Maiquez E., Uruburu F. y Querol A. 2001. Yeast populations dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol* 67(5): 2056-2061.
11. Esteve-Zaroso, B., Belloch C., Uruburu F. y Querol A. 1999. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 49: 329-337.
12. Fachine, D., Pizarro J. y Rossini M. 2005. Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of Cachaca. *Braz J Microbiol* 36:70-74.
13. Fleet, G., Lafon-Lafourcade S. y Ribereau-Gayon P. 1984. Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl Environ Microbiol* 48: 1034-1038.
14. Frazier, W. y D., Westhoff. 1998. Microbiología de los Alimentos. España. Ed. Acibia, S. A., pp: 174-175.
15. Lachenmeier, D., Sohnius, E. M., Atting, R. y López, M. 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J Agric Chem* 54: 3911-3915.
16. Ledauphin, J., Saint-Clair, V., Lablanquie, O., Guichard, H., Fournier, N., Guichard, E. y Barillier, D. 2004. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52:5124-5134.
17. Mas, A., Torija, M., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N., y Guillamón, J. (2002). Selección de levaduras. *Tecnol Vino. Fermentos*. Accesado en: octubre de 2004. Disponible en: <http://www.alcion.es>
18. Mathews, C. y Van Holde, K. 2000. Bioquímica. 2ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana, pp: 495-511.
19. Mignorance-Carzola, L., Clemente-Jiménez, J., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, V., y Rodríguez-Vico, F. 2003. Contribution of different natural yeast to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol* 19: 297-304.
20. Molina Guerero, J. A., Botello Álvarez, J. E., Estrada Baltazar, A., Navarrete Bolaños, J. L. Jiménez Islas, H., Cárdenas Manríquez, M., y Rico Martínez, R. 2007. Compuestos volátiles en el Mezcal. *Rev Mex Ing Quím* 6: 41-50.
21. Moreno, S. 1998. Agave angustifolia. El bacanora desde su origen hasta nuestros días. Una bebida sonorensis con calidad internacional. Instituto del medio ambiente y el desarrollo de Sonora (Imades). *Rev Entorno* 2: 3-5.
22. Moreno, S. 2006. Variabilidad, citogenética, molecular, morfológica y contenido de azúcares reductores totales en poblaciones silvestres de *Agave angustifolia*. Trabajo de Tesis de Doctorado (inédita Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos de Origen Vegetal, Hermosillo, Sonora, México).
23. Muñoz, R., Wrobel, R. y Wrobel, K. 2005. Determination of aldehydes in tequila by High-performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Eur Food Res Technol* 221: 798-802.
24. NOM-168-SCTI-2004. Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCTI-2004, Bebidas alcohólicas-Bacanora- especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. Diario oficial miércoles 14 de diciembre, 2005. 1ª Sección, pp. 37-49.
25. Núñez, L. 2001. La producción de mezcal Bacanora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. pp.226
26. Pataro, C., Guerra, J., Petrillo-Peixoto, M., Mendonca-Hagler, L., Linardi, V., y Rosa, C. 2000. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains with artisan fermentation in Brazil. *J Appl Microbiol* 89: 24-31.
26. Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. 1992a. Dry strains for use in fermentation of alicante wine: selection and DNA patterns. *J Food Science* 57: 183-186
28. Querol, A., E. Barrio, T. Huerta y D. Ramón. 1992b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* 58: 2948-2953.
29. Querol, A., Fernandez-Espinar, M., del Olmo, M. y Barrio, E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol* 8 () 3-10.
30. Romano, P., Paraggio, M. y Turbanti, L. 1998. Stability in By-products formation as a strain selection tool of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *J Appl Microbiol* 84: 336-341.
31. Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caraso M. y Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. *Int J Food Microbiol* 86: 169-180.
32. Steinkraus, K. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8(5/6): 311-317.
33. Suárez, J. 2002. Análisis sensorial (vino). Impacto de levaduras y bacterias en los aromas vínicos fermentativos. Consultado en internet: <http://www.percepnet.com/documenta/Cs0203.pdf>
34. Táboas, R., Maceiras, R., Cancela M., y Alvarez, E. 2002. Study of the alcoholic fermentation in wine "Albariño" influence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and SO₂. *Elect J Environ Agric Food Chem* 1(2):1579-4377
35. TOWMSG. 2007. The Official Website of the Mycoses Study Group. www.doctorfungus.org
36. Wondra, M. y Berovic, M. 2001. Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. *Food Technol Biotechnol* 39(2):141-148.
37. Yáñez, G. 2003. El maguey de Bacanora (*Agave angustifolia*). Instituto del medio ambiente y el desarrollo de Sonora (Imades). *Rev Entorno* 11: 5-8.

Correspondencia:

Evelia Acedo-Félix

Coordinación de Ciencia de los Alimentos.
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo,
A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. 83000,
Hermosillo, Sonora, México.

CAPÍTULO 2

Quantification of major volatile compounds in artisanal bacanora.

Alvarez-Ainza, Maritza Lizeth¹, González-Ríos, Humberto², González-León³, Alberto, Valenzuela-Quintanar, Ana Isabel¹ and Acedo-Félix, Evelia^{1*}

¹ Coordinación de Ciencia de los Alimentos.

² Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Animal.

³ Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Vegetal.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Fax. +(52) 6622892100 Ext. 224

Enviado a:

Journal of Agricultural and Food Chemistry.



Maritza Lizeth Alvarez Ainza <maritza@estudiantes.ciad.mx>

Journal of Agricultural and Food Chemistry - Manuscript ID jf-2011-02903j

support@services.acs.org <support@services.acs.org>

19 de julio de 2011 23:09

Para: evelia@ciad.mx, maritza@estudiantes.ciad.mx

Cc: jafc@jafc.acs.org

20-Jul-2011

RE: Manuscript Submission Successfully Submitted

Journal: Journal of Agricultural and Food Chemistry

Manuscript ID: jf-2011-02903j

Title: "Quantification of Major Volatile Compounds in Artisanal Bacanora"

Authors: Acedo-Felix, Evelia; Alvarez-Ainza, Maritza; Gonzalez-Rios, Humberto; Gonzalez

Leon, Alberto; Valenzuela-Quintanar, Ana

Flavors and Aromas/Chemosensory Perception

Dear Dr. Acedo-Felix:

Your manuscript has been successfully submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry.

You will be receiving an email shortly informing you of the Assigned Editor for this manuscript, along with contact information for that editor.

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus at <http://paragonplus.acs.org/login> and select "Edit Your Account" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <http://paragonplus.acs.org/login>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Sincerely,

Journal of Agricultural and Food Chemistry Editorial Office

Quantification of major volatile compounds in artisanal bacanora.

Alvarez-Ainza, Maritza Lizeth¹, González-Ríos, Humberto², González-León³, Alberto,
Valenzuela-Quintanar, Ana Isabel¹ and Acedo-Félix, Evelia^{1*}

¹ Coordination of Food Science

² Coordination of Technology on Food of Animal Origin

³ Coordination of Technology on Food of Vegetal Origin.

Research Centre for Food and Development, A. C. Road to Victoria Km

0.6. C. P. 83000, P.O. Box. 1735 Hermosillo, Sonora, México. Phone and Fax number:
+(52) 6622892100 Ext. 224.

1 **Summary**

2 Bacanora is an artisanal beverage distilled from agave, which is manufactured on a small
3 scale in the state of Sonora, Mexico. This study identified the major volatile compounds in
4 77 bacanora beverages by gas chromatography, to determine the samples that comply with
5 the Mexican Standards for bacanora. The samples were collected in 28 municipalities in the
6 area with the denomination of origin (ADOB). It was found that only 55.8 % of the
7 samples (43) meet the parameters established in the Official Mexican Standards, whereas
8 44.2 % of the samples (34) do not comply: 3 samples for alcohol content, 8 for
9 acetaldehyde, 1 for esters, 11 for methanol and 17 for higher alcohols. Some of the samples
10 do not comply because of more than one analyzed parameter. The bacanora samples
11 showed great variability among the sampled regions as well as within the same
12 municipalities ($p \leq 0.05$).

13 *Key words:* alcoholic beverages, Bacanora, volatile compounds.

14 **Introduction**

15 Bacanora is a distilled beverage with high alcohol content and is produced on a
16 small scale in the area with the denomination of origin (ADOB), which comprises 35
17 municipalities of the state Sonora in northwestern Mexico. The traditional production of the
18 drink is performed using wild agave (*Agave angustifolia* Haw.). The process starts by
19 cooking the core of the agave, called the *piña* (pineapple) to hydrolyze inulin, which is the
20 carbohydrate reserve in the *piña*, into mostly fructose (95 %). After grinding and water
21 addition, spontaneous alcoholic fermentation proceeds for 7 to 14 days, depending on the
22 temperature high and region. When the ferment is ready, a first distillation is performed. At
23 the end, the bagasse is discarded, and the product is subjected to a second distillation in
24 which three parts are collected: the head, media and tail. Then, the beverage is adjusted or
25 mixed depending on the particular preference of each artisanal producer. This yields a
26 product with an alcohol content ranging between 38 and 55 % (1, 2, 3).

27 Other agave-distilled beverages can be found in México, such as tequila, mezcal and
28 sotol, each with its own ADOB and Official Mexican Standards (3, 4, 5). Tequila is

29 elaborated only on an industrial standardized scale and has international recognition. The
30 others are still produced on a small scale and, in some cases, without regulations.
31 Particularly for bacanora, there are no studies describing the composition of this beverage,
32 in contrast to tequila or mezcal, which are more commercially produced. A report exists
33 where tequila presented less variability and better complied with the Official Mexican
34 Standards, followed by mezcal, while sotol and bacanora had greater variability. However,
35 the quality of an alcoholic beverage is not only measured by its ability to meet the
36 specifications of the official standards that are enforced but also by other factors, such as
37 compounds that contribute to consumer acceptance. The importance of the Official
38 Mexican Standards is to control beverages that cause damage to humans, described in the
39 Mexican Norm for bacanora NOM-168-SCFI-2004, such as beverages with high methanol
40 content (Table 1) (6).

41 During alcoholic fermentation performed by yeast, ethanol and CO₂ are the main
42 products of metabolism, but other compounds are also produced that contribute to the
43 flavor (taste and aroma) and are known as secondary products of fermentation (7).
44 Regarding the composition of tequila, more than 175 volatile compounds have been
45 distinguished, including high amounts of alcohols and low amounts of esters, acetals,
46 terpenes, furans, acids, aldehydes, ketones, phenols and sulfides (8). In mezcal, another
47 artisanal beverage, 85 different components have been reported, 30 of which have already
48 been reported as important odorants in other alcoholic beverages and 76% of these are
49 found in Tequila. The predominating compounds in mezcal were alcohols, esters and
50 organic acids (9, 10). It was also observed that the profile of volatile items depends on the
51 amount and type of the fructans contained in the agave plant (11). The primary aroma
52 component of these beverages comes from the agave plant. They can undergo chemical
53 transformation or can be modified during the process. The secondary aroma compounds are
54 produced during the cooking, fermentation, distillation and maturity processes (12).

55 Few studies on bacanora quality have identified volatiles, such as ethanol, organic
56 acids, esters, aldehydes, ketones, terpenes and other minor hydrocarbons (13, 14, 15).
57 However, there are no studies on whether the beverages that are currently elaborated in the
58 ADOB comply with the parameters established in the Official Mexican Standards.

59 Currently, efforts are being made to establish formal standard methods of production for
60 industrialization, which has attracted interest in the chemical characterization of the
61 bacanora produced in the different municipalities of ADOB. The aim of this study was to
62 evaluate the major volatile compounds in artisanal bacanora, which is still produced on a
63 small scale within the ADOB.

64 **MATERIALS AND METHODS**

65 *Chemicals and bacanora samples*

66 Acetaldehyde, ethyl acetate, acetal, methanol, 2-butanol, ethyl butyrate, 1-propanol,
67 2-methyl-1-propanol, 2-propen-1-ol, 1-butanol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol
68 (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker) were used as standards. A total of 77 samples were
69 obtained of the beverage produced in the different municipalities of ADOB. The ADOB
70 was divided into 4 regions: 18 samples from the Sonora River (7 municipalities), 20
71 samples from the High Sierra (10 municipalities), 21 samples from the Sierra (10
72 municipalities), and 16 samples from the Central and Southern Region (9 municipalities)
73 (3).

74 *Analysis of Alcohol Content*

75 The alcohol content, expressed as % alcohol volume (% alc. vol.), was evaluated
76 using a set of calibrated breathalyzers (Dujardin-Salleron, Paris, France) and a calibrated
77 thermometer (Kessler, USA) (16).

78 *Chromatographic analysis of the major volatile*

79 The quantitative determination of the major volatile compounds presents in the
80 samples of bacanora was performed using gas chromatography (GS) with flame ionization
81 detection (FID). The method was based on the recommendations of the norm published by
82 the Mexican government (3). The GS system used was a Varian CP-3800 model. The
83 separation was performed using a capillary column (US5247141H DB-WAX J. W.
84 Scientific) with a 60 m x 0.25 mm internal diameter and a film thickness of 0.25 μm . The
85 carrier gas was nitrogen, set at a flow rate of 1 mL/min. Nitrogen was also used as a make-

86 up gas, or auxiliary, set at a rate flow of 25 mL/min, with hydrogen and air set at flow rates
87 of 30 and 300 mL/min, respectively, at the detector. The temperature program used
88 consisted of an initial hold at 34 °C for 12.5 minutes, followed by a gradual warming of 4
89 °C per minute to 105 °C and then a second gradual warming of 15 °C per minute to reach a
90 final temperature of 150 °C, which was maintained for 1 minute. The injection port
91 temperature was set at 200 °C. The samples were directly injected after adding the internal
92 standard (2-pentanol) using a split injection mode in an automated manner (1 µL, 10:1). For
93 the quantification, peak area ratios of different volatiles according to the internal standard
94 were calculated as a function of the concentrations of the substances. The programming of
95 the gas chromatograph oven temperature and carrier gas flow was selected to achieve
96 greater clarity and definition of the separation of the peaks in the chromatograms without
97 interference by the overlap of peaks.

98 *Statistics*

99 All data were processed using the statistical package NCSS 2007 (Kaysville, Utah,
100 USA). Initially, descriptive statistics were used to understand the centrality and dispersion
101 of the data. Subsequently, one way analysis of variance (ANOVA) was performed to
102 estimate differences between regions. Mean comparisons were performed with the Tukey-
103 Kramer test. Significance was estimated at a 0.05 probability level with a type I error.

104 **Results and Discussion**

105 The samples were collected only from the 28 municipalities considered within the
106 ADOB. Bacanora beverages analyzed in the present work were elaborated with 100% *A.*
107 *angustifolia* Haw. It was observed at the time of sampling that some producers elaborate a
108 beverage called “bacanora,” but they do not use the *piña* from *A. angustifolia* Haw. as the
109 raw material, as stated in the Mexican Official Standards (3). Instead, these beverages are
110 produced with *Agave lechuguilla*, which is abundant in the High Sierra, but these were not
111 included in this study.

112

113

114 *Alcoholic content*

115 Most of the analyzed samples, except four, were in agreement with the Mexican
116 Official Standards for alcohol content (3). Three of them exceeded the 55 % alc. vol.
117 standard for alcoholic strength, and one of them showed an alcoholic content below the
118 lower level of the official standard of 36.7 % alc. vol. Table 1 shows the regulated
119 parameters and established content for safety by the Official Mexican Standards for
120 Bacanora.

121 *Chromatographic analysis*

122 The results of the analysis by gas chromatography showed that 39 % of the samples
123 did not meet the requirements established in the Official Mexican Standards. Six samples (8
124 %) exceeded the parameters for aldehydes (as acetaldehyde), with a concentration higher
125 than 40 mg/dL of anhydrous alcohol. One sample (1.3%) exceeded the parameters for
126 esters (concentration of ethyl acetate and ethyl butyrate), with concentrations greater than
127 200 mg/dL of anhydrous alcohol. Eleven samples (14.6 %) showed methanol
128 concentrations over 300 mg/dL of anhydrous alcohol. Seventeen samples (22.6 %) showed
129 higher alcohol (i.e., the sum of 2-butanol, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-propen-1-ol,
130 1-butanol and 2-/3-metil-1-butanol) concentrations greater than 400 mg/dL of anhydrous
131 alcohol. Table 2 shows descriptive statistics of the results of the samples in the different
132 regions of ADOB.

133 There was great variability in the volatile content among the different regions and
134 even among samples of the same region. The Sonora River region shows the highest
135 variability between samples, with higher coefficients of variation than the other regions. It
136 was observed that the Sierra region had the highest mean of five compounds specified in
137 the Official Mexican Standards, including acetaldehyde and methanol. This high variability
138 is attributed to the process because Bacanora is still elaborated in an artisanal way, which
139 produces unique, irreproducible features for this spirit, even by the same producer. Table 3
140 shows the results of the ANOVA of the groups of compounds that are specified in the
141 Official Standards for Bacanora. It was observed that the ethanol, aldehydes and methanol
142 contents were significantly different between regions ($P \leq 0.05$). The Sierra region showed

143 the highest means in ethanol, aldehydes and methanol and was significantly different from
144 the values observed in the central/southern regions. No significant differences were found
145 in higher alcohols and esters among the regions sampled.

146 Ethanol is one of the main products of yeast fermentation. However, some higher
147 alcohols may be produced by yeast during the catabolism of amino acids or from the
148 reduction of aldehydes. Esters are also produced by esterification reactions of ethanol and
149 other alcohols (8, 9, 10). The excessive production of acetaldehyde and ethyl acetate is
150 often correlated with hygiene practice, considering that the fermentation used in this kind of
151 production is natural; not only yeast are involved, other microorganism are present, such as
152 spoiler bacteria (15).

153 The higher alcohols described in this study are those known as fusel alcohols or
154 fusel oils (alcohols with two or more carbons) formed by fermentation. Excessive
155 concentrations of these fractions may cause undesired flavors, sometimes described as
156 spicy, hot or solvent-like. During distillation, fusel alcohols are concentrated at the end of
157 the process (known as the tail among bacanora producers). The higher alcohols have an oily
158 consistency, which is noticeable in distilled products, hence, the name fusel oil (17). It was
159 observed that these groups of compounds were the most problematic in this study when
160 they were compared with the parameters described in the official standards. These
161 compounds showed the largest numbers of samples with concentrations higher than those
162 specified in the Official Mexican Standards (22.6 % of the samples). The distillation method
163 used for bacanora production is simple distillation in metallic “alambique,” and the last part
164 of the distilled product (known as the tail or “colas”) is used to dilute the middle part
165 section of bacanora. Few producers use distilled water to dilute the middle portion, which is
166 between 60 and 70 % alcohol, to create the final alcohol content of the beverage, according
167 to the Mexican norm. These practices create a higher alcohol content than what is outlined
168 in the Official Mexican Standards.

169 However, methanol is produced during the cooking process of agave “piñas” due to
170 the demethylation of pectins in unripe agaves or by high temperatures during cooking and
171 the low pH of the agave juices (“saite”). Moreover, there are published data which refer to

172 the production of methanol by some strains of yeast that have the enzyme pectin methyl
173 transferase, which hydrolyzes agave pectin (7, 18, 19). Methanol is a compound that, in
174 high concentrations, may cause damage to humans. The mean concentrations of methanol
175 for all analyzed samples were relatively low, as in other Mexican beverages, such as tequila
176 and mezcal. In this study, the highest concentration was 580 mg/dL of anhydrous alcohol,
177 but according to Lachenmeier et al. (2006), these levels are not yet of toxicological
178 relevance (3, 15), although the Official Mexican Standards require a concentration of 300
179 mg/dL or less. Lachenmeier et al. (2006) reported that bacanora was characterized by high
180 concentrations of acetaldehyde however, in our analysis, only 8% of the samples showed
181 high concentrations of acetaldehyde. They also evaluated only 13 samples of bacanora,
182 and of these, six (46%) contained high concentrations of methanol, with the highest
183 concentration of anhydrous alcohol at 601 mg/dL. Their results are similar the results of
184 this study (15).

185 The main volatiles for tequila and mezcal agave are higher alcohols, esters,
186 aldehydes and methanol, the most abundant higher alcohols being amyl alcohol, isoamyl,
187 isobutanol, n-propanol, n-butanol and 2-phenylethanol. Yeast has been implicated as the
188 most important influential factor in the formation of volatiles. Native strains in Tequila
189 have been reported to be producers of large quantities of compounds, such as isoamyl
190 alcohol (2-methyl-1-butanol) and isobutanol (2-butanol), compared to strains used in
191 baking (10, 12). According to the results obtained from bacanora, these volatile compounds
192 are also present in high quantities; however, in tequila, they meet the specifications of the
193 Official Standards. Based on this fact, we can deduce that the native strains present in the
194 preparation of bacanora have characteristics similar to the native strains present in the
195 production of tequila.

196 The bacanora industry is still developing, and there is a need for a regulatory
197 council or official institution to regulate this beverage, as exists for Tequila and other
198 beverages. Interest in bacanora studies has been generated by its producers to assess their
199 products to standardize the process and to offer a better product (1, 20). Given the lack of
200 studies on bacanora, especially on the compounds that characterize this beverage, we
201 recommend that studies be performed to evaluate both the chemical and the sensory

202 composition (including minority compounds), as has been carried out for tequila and
203 mezcal. However, producers also believe that it is important to maintain the identity of their
204 bacanora and retain their organoleptic characteristics, which can be accomplished by
205 conducting this type of study.

206 **Conclusions**

207 The 77 samples collected show a great variability among the sampled regions as
208 well as within the same municipalities ($p \leq 0.05$). It was found that only 55.8 % of the
209 samples (43 bacanoras) meet the parameters established in the Official Mexican Standards,
210 whereas 44.2 % of the samples (34 bacanoras) do not comply: 3 samples for alcohol
211 content, 8 for acetaldehyde, 1 for esters, 11 for methanol and 17 for higher alcohols. Some
212 of the samples do not comply because of more than one analyzed parameter. The bacanora
213 samples showed great variability.

214 *Acknowledgements*

215 The authors want to thank the technical assistance of J. Villegas, A. Dominguez, P.
216 Grajeda-Cota and T. Carvallo-Ruiz. We also thank the Consejo Nacional de Ciencia y
217 Tecnología (CONACyT) for the scholarship for M. Alvarez-Ainza.

218 **References**

- 219 (1). M. L. Alvarez-Ainza, K. A. Zamora-Quiñonez, E. Acedo-Félix. Perspectivas para el
220 uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Rev. Latinoam. Microbiol.*
221 *51* (2009) 58-63.
- 222 (2). M. L. Gutiérrez-Coronado, E. Acedo-Félix, A. I. Valenzuela-Quintanar. Industria
223 del Bacanora y su proceso de Elaboración. *Cienc. Technol. Aliment.* *5* (2007) 394-404.
- 224 (3). NOM-168-SCTI-2004. Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Bacanora-
225 especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. *Diario oficial*, 2005.
- 226 (4). NOM.006-SCFI-1994. Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Tequila-
227 especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. *Diario oficial*, 1997.
- 228 (5). NOM.070-SCFI-1994. Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Mezcal-
229 especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. *Diario oficial*, 1997.

- 230 (6). V. Tesevic, N. Nikicevic, A. Jovanovic, D. Djokovic, L. Vujisic, I. Vuckovic, M.
231 Bonic. Volatile Components from Old Plum Brandies. *J. Food Tech. Biotechnol.* 43
232 (2005) 367-372.
- 233 (7). D.M. Díaz-Montaño, M. Délia, M. Estarrón-Espinoza, P. Strehaiano. Fermentative
234 capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana*
235 Weber juice. *Enzym. Microb. Technol.* 42 (2008) 608-616.
- 236 (8). M. Been, L. Peppard. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory
237 analysis. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 557-566.
- 238 (9). J. Molina-Guerero, J. Botello-Alvarez, A. Estrada-Baltazar, J. Navarrete-Bolaños,
239 H. Jimenez-Islas, M. Cárdenas-Manríquez, R. Rico-Martínez. Compuestos volátiles en el
240 Mezcal. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6 (2007) 41-50.
- 241 (10). A. De León-Rodríguez, L. González-Hernández, A. Barba de la Rosa, P. Escalante-
242 Minakata. M. López. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic
243 alcoholic beverage obtained from *Agave Salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1337-
244 1341.
- 245 (11). D. Muñoz-Rodríguez, K. Wrobel, K. Wrobel. Determination of aldehydes in tequila
246 by high-performance liquid chromatography with 2,3-dinitrophenylhydrazine. *Eur. Food*
247 *Res. Techno.* 221 (2005) 798-802.
- 248 (12). A. Peña-alvarez, A. Díaz, A. Medina, C. Labastida, S. Capella, L. Vera.
249 Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase
250 microextraction-gas-chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A.* 1027,
251 (2004) 131-136.
- 252 (13). B. Vallejo-Córdoba, A. Gonzalez-Córdoba, M. Estrada-Montoya. Latest advantages
253 in the characterization of Mexican distilled agave beverage: tequila, mezcal and bacanora.
254 *Proceedings of the 229th ACS meeting*, San Diego, CA. (2005) AGFD-113.
- 255 (14). D. Lachenmeier, E. Sohnius, R. Attin, M. López. Quantification of selected volatile
256 constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J.*
257 *Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3911-3915.
- 258 (15). NMX-V-013-NORMEX-2005. Norma Mexicana, Bebidas Alcohólicas-
259 Determinación del contenido alcohólico (por ciento de alcohol en volumen a 293 K)
260 (20°C) (% Alc. Vol.)-Métodos de Ensayo (Prueba). *Diario Oficial*, 2005.

- 261 (16). P. Lappe-Oliveras, R. Moreno-Terrazas, J. Arrizón-Gaviño, T. Herrera-Suárez.
262 Yeast associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled
263 *Agave* beverage. *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 1037-1052.
- 264 (17). L. Hazelwood, J. Daran, A. van Maris, J. Pronk, J. Dickinson. The Ehrlich pathway
265 for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae*
266 metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2259–2266.
- 267 (18). A. Vera Guzmán, P. Santiago García, M. López. Aromatic volatile compounds
268 generated during mezcal production from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum*. *Rev.*
269 *Fitotec. Mex.* 32 (2009), 273-279.
- 270 (19). C. Cedeño. Tequila producción. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15 (1995) 1-11.
- 271 (20). L. Núñez. *La producción de mezcal Bacanora*. Centro de Investigación en
272 Alimentación y Desarrollo, A.C. Press. México (2001)

Table 1. Regulated safety parameter and content established for the Official Mexican Standards for Bacanora (3).

Parameter	NOM-168-SCFI-2004 specification
Plant type	<i>Agave angustifolia</i> Haw
Alcohol strength (vol %)	38-55
Aldehydes (g/hL of alcohol)	0-40
Esters (g/hL of alcohol)	2-200
Methanol (g/hL of alcohol)	30-300
Higher alcohols (g/hL of alcohol)	100-400

Tabla 3. Described statistic of the major compounds in the bacanora obtained of ADOB by regions.

Region/compounds	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Central and Southern													
Media	44.31	8.37	37.46	6.57	152.29	0.013	0	17.58	64.43	0.412	0.602	183.76	0.233
S. D.	1.85	5.66	41.61	4.36	63.84	0.052	0	5.39	32.76	0.262	0.276	60.86	0.458
C.V.	4.17	67.62	111.07	66.36	41.92	401.53	0	30.65	50.84	63.70	45.84	33.11	196.19
Min.	41.3	2.22	8.66	1.84	81.3	0	0	10.37	36.81	0	0.36	97.73	0
Max.	47.6	18.8	153.68	16.22	269.67	0.202	0	28.75	163.18	0.8562	1.43	263.97	1.72
River Sonora													
Media	45.34	16.37	70.9	15.90	228.58	0.121	0.175	22.80	50.59	0.598	0.617	148.75	0.527
D.S.	5.57	23.09	57.55	28.18	112.47	0.165	0.499	11.24	27.34	0.834	0.417	55.06	0.764
C.V.	12.28	141.03	81.17	177.23	49.20	136.27	284.34	49.29	54.04	139.56	66.67	37.01	144.9
Min.	36.7	0	8.57	2.86	83.69	0	0	9.91	27.8	0	0.283	67.52	0
Max.	55.7	108.76	192.86	128.88	580.51	0.477	2.18	50.56	139.31	3.98	2.1	318.3	2.79
High Sierra													
Media	47.26	10.43	35.64	9.31	145.25	0.441	0.390	20.17	35.88	0.556	1.001	138.15	0.595
D.S.	3.39	7.18	21.82	6.48	47.13	0.565	0.537	13.70	17.10	0.537	0.865	68.39	0.819
C.V.	7.17	68.83	61.22	69.6	280.91	128.23	137.50	67.92	47.65	96.62	86.48	49.50	137.53
Min.	41.8	1.79	7.51	1.24	110.23	0	0	7.07	4.17	0	0.322	13.13	0
Max.	52.8	24.03	82.79	22.29	573.84	2.48	1.91	70.15	61.33	2.35	4.09	239.98	2.739
Sierra													
Media	47.27	30.96	69.14	35.07	280.91	0.211	0.262	24.61	47.61	.5598	1.596	156.31	0.546
D.S.	3.39	34.21	103.10	46.93	131.82	0.416	0.515	10.76	16.54	0.292	1.57	44.24	1.28
C.V.	7.5	110.49	149.11	133.81	46.92	197.20	196.08	43.72	34.74	52.30	98.74	28.30	2.3
Min.	41.9	3.94	10.94	3.14	110.23	0	0	11.09	19	.263	0.313	76.8	0
Max.	56.8	151.02	490.51	213.44	575.84	1.78	2.23	62.45	76.97	1.494	7.13	240	5.73

S.D.: Standard deviation; C.V.: coefficient of variation; Min.: minimum value in the samples; Max. maximum value in the samples; I, ethanol; II, acetaldehyde; III, ethyl acetate; IV, acetal; V, methanol; VI, 2-butanol; VII, ethyl burytate; VIII, 1.propanol; IX 2-methyl-1-propanol; X, 2-propen.1-ol; XI, 1.butanol, XII y XIII, 2/3methyl-1-butanol.

Table 3. Means values of quantified major volatile compounds expressed as mg/dL of anhydrous alcohol (specified on the Official Mexican Standards) from Bacanora beverage by Regions.

Parameter	Regions				ESM	P value
	Central/southern	River Sonora	High Sierra	Sierra		
Ethanol	44.31 ^a	45.34 ^{ab}	47.26 ^{ab}	48.42 ^b	0.88	0.01*
Aldehydes	3.37 ^a	11.50 ^a	10.43 ^a	30.96 ^b	4.93	0.002*
Methanol	152.29 ^a	228.58 ^a	145.25 ^a	280.91 ^b	21.84	0.001*
Esters	37.46 ^a	71.08 ^a	36.36 ^a	69.40 ^a	16.93	0.09
Higher alcohols	389.04 ^a	344.03 ^a	311.50 ^a	343.49 ^a	21.35	0.06

ESM: error standard of the media; *Significant differences $P \leq 0.05$.

CAPÍTULO 3

Análisis sensorial y de compuestos minoritarios en destilados de *Agave angustifolia* Haw. (Bacanora)

Maritza Lizeth, Alvarez-Ainza¹, Humberto González-Ríos², Delia Aideé Orozco-
Hernández³ y Evelia Acedo-Félix^{1*}

¹Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Tel. y Fax. 01 (662) 289 24 00 Ext. 224 y 267.

²Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³Casa Herradura, S.A. de C. V. Camino a la Barranca del Tecuane. 45380. Amatitán, Jalisco, México.

Preparado conforme el formato de envío para la revista:

Revista Fitotecnia Mexicana.

**ANÁLISIS SENSORIAL Y DE COMPUESTOS VOLÁTILES
MINORITARIOS EN DESTILADOS DE *Agave angustifolia* Haw.
(BACANORA).**

**SENSORIAL ANALYSIS AND MINOR VOLATIL COMPOUNDS OF
DISTILLED FROM *Agave angustifolia* Haw (BACANORA).**

Maritza Lizeth, Alvarez-Ainza¹, Humberto González-Rios², Delia Aideé Orozco-Hernández³ y Evelia Acedo-Félix^{1*}

¹Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. Tel. y Fax. 01 (662) 289 24 00 Ext. 224 y 267.

²Coordinación de Tecnología de los Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km 0.6. C. P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³Casa Herradura, S.A. de C. V. Camino a la Barranca del Tecuane. 45380. Amatitán, Jalisco, México.

*Autor para correspondencia (evelia@ciad.mx)

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron los perfiles sensoriales de 44 bebidas de bacanora elaboradas en el área con denominación bacanora (ADOB), con los perfiles obtenidos por el panel entrenado se correlacionaron algunos compuestos minoritarios en las bebidas. Adicionalmente se realizó un análisis sensorial de preferencia de los diferentes perfiles de bacanora encontrados con consumidores. El panel entrenado diferenció ocho perfiles diferentes y describieron atributos de olor, aroma, gusto y sensaciones trigeminales. No se encontraron diferencias en los atributos sensoriales examinados por el panel entrenado, a excepción del atributo correspondiente al olor a humo ($P \leq 0.05$), relacionándose éste con la forma de elaboración, la cual es muy rudimentaria. No se encontraron mayores variaciones significativas en los atributos, debido principalmente a que las muestras *per se* cuentan con mucha variabilidad dentro del ADOB, e incluso entre las muestras del mismo productor. Algunos de los compuestos analizados están relacionados con los atributos descritos en este estudio por el panel entrenado, algunos de ellos asociados a la materia prima (olor y aroma a agave y agave verde) y otros al proceso de fermentación (frutal, alcoholizado, etc.). Estos compuestos tienen una participación importante en el impacto del aroma y tipicidad de la bebida. El análisis con consumidores mostró que el perfil representado con la muestra 72 del municipio de Huépac fue la preferida por el 41 % de los participantes y se describió como una bebida suave, de buen olor, sabor y con cuerpo.

Palabras clave: bacanora, *Agave angustifolia* Haw, atributos sensoriales, compuestos volátiles.

SUMMARY

This study evaluated the sensory profile of 44 bacanora drinks made in the area with the denomination of origin (ADOB), and the profiles obtained were correlated with some minor compounds present in the beverage. Additionally, a sensory analysis of preference with consumers was made with the different profiles of bacanora. The trained panel could distinguish eight different profiles and described various attributes of smell, aroma, taste and trigeminal sensations. The samples showed no differences in the sensory attributes examined by the trained panel, except the attribute of smoke smell ($P \leq 0.05$), this relates to the type of processing, which is very rudimentary at present. May not be able to determine more significant variations in the attributes, mainly because the samples have much variation within Adobe, and even between the same producer. Some minor compounds are related to the attributes described in this study by the trained panel, some of them associated with the raw material (smell and aroma of agave, agave green) and others to the fermentation process (fruity, Alcohol, etc.). Possibly these compounds have an important role in the impact of the flavor and authenticity of this drink. The consumer sensory analysis showed that the profile represented by the sample 72 of the municipality of Huépac was preferred by 41 % of the consumers and was described as a soft drink, good smell, flavor and body.

Index words: bacanora, *Agave angustifolia* Haw, sensory attributes, volatile compounds.

INTRODUCCIÓN

En México existen diferentes bebidas destiladas de agave, las cuales están teniendo un gran auge a nivel nacional e internacional como tequila, mezcal, sotol y bacanora. La principal diferencia entre estas bebidas es el tipo de agave utilizado como materia prima, el cual contiene fructanos (de cadena larga tipo inulina y ramificados tipo neo-fructanos), como material de reserva de la planta (Mancilla-Margalli y Lopez, 2006; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

El Bacanora es una bebida tradicional del estado de Sonora, México, la cual se elabora de manera artesanal en el Área de Denominación Origen Bacanora (ADOB), que comprende a 35 municipios de ese estado, ubicados la mayoría en la sierra sonorense (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007, Alvarez-Ainza *et al.*, 2009). La elaboración de las bebidas a base de agave, comienza con la recolecta y jima de las piñas de agave silvestre, posteriormente se realiza una cocción de las piñas en hornos rústicos, generalmente bajo tierra, para hidrolizar la inulina, que es el carbohidrato de reserva y para facilitar el molido de las piñas. Durante la cocción se forman compuestos importantes involucrados en las características sensoriales del producto final, como aldehídos y compuestos de Maillard (Muñoz-Rodríguez *et al.*, 2005; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Una vez cocidas las piñas, estas son molidas y desfibradas y sometidas a fermentación natural por la microbiota presente en los mostos durante varios días, tiempo que varía dependiendo de la región, temperatura y condiciones del agua. Finalmente el mosto fermentado es destilado dos veces, donde se obtiene un producto de 38-55 % de alcohol volumen (Gutiérrez-Coronado *et al.*, 2007; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Alvarez-Ainza *et al.*, 2009, NOM-168-SCTI-2004).

En estudios realizados en bebidas a base de agave, se ha observado que son diferentes los compuestos involucrados en el aroma y sabor, por ejemplo: alcoholes, ácidos grasos, ésteres, aldehídos, terpenos, fenoles, lactonas, compuestos azufrados, etc. (Vallejo-Cordoba *et al.*, 2004; de León-Rodríguez *et al.*, 2008). Las bebidas poseen un aroma primario el cual proviene de la materia

prima utilizada, en el caso de las bebidas destiladas de agave, proviene del tipo de agave. Un segundo aroma que proviene de la fermentación, destilación y maduración del producto (Peña-Alvarez *et al.*, 2004).

El aroma esta constituido por diversos compuestos volátiles, como los aromáticos, que se encuentran en concentraciones relativamente altas (como los alcoholes superiores) denominados compuestos mayoritarios, algunos tóxicos (como metanol), mismos que se tratan de controlar durante el proceso y cuya concentración está regulada por las Normas Oficiales Mexicanas (DOF, 2005). Existen compuestos en menor concentración denominados minoritarios, como los ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, ácidos grasos, furanos, terpenos, naftalenos y alquenos, los cuales tienen un gran impacto en el aroma y sabor de las bebidas, gracias a la armonía que su combinación presenta (Peña-Alvarez *et al.*, 2004; de León-Rodríguez *et al.*, 2006; de León Rodríguez *et al.*, 2008; Vera-Guzmán *et al.*, 2009).

Sin embargo, la calidad de una bebida alcohólica no solamente consiste en cumplir con las especificaciones de las normas oficiales vigentes, sino también de otros factores, siendo el más importante la aceptación del consumidor, en función a las características sensoriales que éste percibe. Las características sensoriales se asocian a la composición de la bebida, ya que la interacción de los compuestos volátiles entre sí y el paladar del consumidor son los que van a producir la sensación de sabor y aroma (Tesevic *et al.*, 2005).

Para la mayoría de las bebidas mexicanas destiladas de agave, no se han reportado estudios con análisis sensoriales para poder asociarlos a los diferentes compuestos que constituyen la bebida, en el caso de tequila posiblemente por políticas industriales y en las otras bebidas por ser aún artesanales. Actualmente no se conoce el perfil sensorial de la bebida bacanora y cual es la preferencia del consumidor respecto de las bebidas elaboradas en el ADOB. Es por esto, que el objetivo del presente trabajo fue conocer el perfil sensorial de bacanoras elaborados en el ADOB

correlacionando éste con algunos compuestos minoritarios, así como también realizar un análisis sensorial de preferencia de los diferentes perfiles de bacanora, con consumidores habituales de la bebida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis sensorial con panel entrenado y consumidores

Sorting. Se realizó una evaluación sensorial de 44 bebidas de bacanora mediante un panel entrenado (30 jueces), perteneciente a la tequilera Casa Herradura. Las muestras evaluadas cumplían con las especificaciones de la NOM (NOM-168-SCTI-2004). Primeramente las muestras fueron diluidas al 20 % de alcohol volumen y presentadas a los jueces en copas de vidrio cubiertas con un vidrio reloj e identificadas con dígitos de tres números al azar, se dispuso de agua y galletas para enjuagar la boca entre muestras para realizar el análisis de sorting. Se hizo un arreglo estadístico mediante cuadros latinos, cada juez evaluó el mismo número de muestras y cada muestra fue evaluada el mismo número de veces. En este mismo análisis, los jueces del panel entrenado identificaron los atributos que constituyen a cada bebida dando así una descripción cualitativa de la bebida.

Análisis descriptivo cuantitativo (QDA). Se analizaron los atributos descritos por los jueces en la prueba de sorting, se cuantificaron estandarizando las bebidas a 20 % alcohol volumen. Las bebidas se presentaron a los jueces en copas de vidrio cubiertas con un vidrio reloj e identificadas con dígitos de tres números al azar, se dispuso de agua y galletas para enjuagar la boca entre muestras.

Análisis Sensorial con Consumidores. Se realizó un análisis de preferencia con ranking, utilizando una escala hedónica para reforzar los datos. Las bebidas fueron presentadas como se obtuvieron de los productores, sin estandarizar y se presentaron a los consumidores en copas de

vidrio cubiertas con un vidrio reloj e identificadas con dígitos de tres números al azar, se dispuso de agua y galletas para enjuagar la boca entre muestras. Además se dejó un espacio en blanco en el formato de calificación, para tomar en cuenta los comentarios de los consumidores habituales de la bebida.

Cuantificación de compuestos minoritarios por cromatográfico-espectrometría de gases (GC-MS). Este análisis fue realizado en Casa Herradura S. A. de C. V. Se realizó la determinación de los compuestos volátiles minoritarios como el 1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), hexanoato de etilo, octanoato de etilo, ácido etanoico (ácido acético), trans-2-nonenal, ácido propiónico, 5-metil-furfural, ácido butírico, ácido isovalérico, α -terpineol, fenil acetato de etilo, dodecanoato de etilo, ácido hexanoico, 5-metoxi-fenol (guaiacol), alcohol de fenetilo, ácido tetradecanoico, ácido octanoico, 2-isopropil-2-metilfenol (carvacrol), hexadecanoato de etilo, ácido decanoico e isoeugenol de 44 bacanoras obtenidos del ADOB. Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas y un detector de flama (FID). Se utilizó 2-pentanol como estándar interno, de acuerdo a las condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Analítica de Casa Herradura.

Análisis de Resultados. Los datos obtenidos del QDA de los atributos sensoriales, fueron normalizados mediante la fórmula valor observado-media/desviación estándar. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para estimar diferencias en cada uno de los atributos entre las muestras seleccionadas. Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de rango múltiple de Tukey-Kramer y las significancias se estimaron a un nivel por debajo de 0.05 en el error. Adicionalmente y con el fin de estimar correlaciones entre las variables medidas y reducir su dimensionalidad para su interpretación, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP). Finalmente se realizaron correlaciones entre los compuestos minoritarios evaluados y los atributos sensoriales descritos por el panel entrenado. Todos los análisis fueron realizados en el paquete estadístico NCSS 2007 (Kaysville, Utah, USA).

RESULTADOS

Análisis sensorial con panel entrenado y consumidores.

Sorting. El análisis sensorial realizado mediante sorting con el panel entrenado, ayudó a agrupar las muestras por características similares y se obtuvieron 8 grupos o perfiles (Figura 1). De estos grupos, 7 de ellos estaban conformados por una sola muestra, y un grupo mayoritario, compuesto por 37 muestras. Seguramente las muestras de bacanora son muy semejantes entre ellas, posiblemente por su forma de elaboración artesanal de siempre, por lo que se formó el grupo mayoritario. Los perfiles con una sola muestra pertenecían a los municipios de Moctezuma (dos muestras), Cumpas (dos muestras), Opodepe (una muestra), Tepache (una muestra) y la última de Huépac. La muestra que representó al octavo grupo fue elaborada también en Opodepe, por lo que podemos aseverar que los jueces fueron capaces de discriminar entre muestras de un mismo municipio. Así mismo, en este análisis de sorting, se les pidió a los jueces que describieran los atributos que percibían en las bebidas, coincidiendo éstas en la mayoría de las muestras. Se distinguieron atributos percibidos por la nariz (atributos de olor), los percibidos retronasalmente al probar la bebida (aroma), los percibidos por el gusto y de sensaciones trigeminales (ambos percibidos en lengua). Para olor (O) y aroma(A) se describieron las notas de: acedo, agave cocido, agave verde, ahumado, cabezas cítrico, frutal, mentol, paja, aceite, alcoholizado, floral, cuero, herbáceo, herbal, metal, humedad, humo, moho, ordinario, plástico, quemado, solvente, tierra mojada y tufoso. Para gusto (G) las notas de: dulce, ácido y amargo, mientras que para sensaciones trigeminales (ST) los atributos de astringente, ríspido y quemante. Los atributos encontrados en la bebida son debidos tanto a la materia prima (agave verde, agave cocido, ahumado, humo, etc) como al proceso de fermentación (frutal, Alcoholizado, etc), principalmente a este último que es cuando

se producen los compuestos de aroma por las levaduras presentes (De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Díaz-Montaña *et al.*, 2008; Lachenmeier *et al.*, 2006).

Análisis descriptivo cuantitativo (QDA). De cada uno de los atributos descritos por el panel entrenado (30 jueces) se obtuvieron valores cuantitativos de 0-15 (Figura 2). Para el análisis de los datos y disminuir un poco la dimensión de los datos, se tomó como consideración técnica que aquellos atributos con valores menores a 3.0 serían descartados. Posteriormente con los datos de los atributos con valores mayores a 3.0 se realizó un ANOVA (Cuadro 1), de los ocho perfiles diferentes de bacanora identificados por los jueces. Se puede observar que únicamente el olor a humo (O-humo) es el que mostró diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles encontrados por el panel entrenado ($P \leq 0.05$). Dadas las diferencias en esta nota aromática o atributo se pueden distinguir dos perfiles diferentes. Es posible que la manera de elaborar la bebida sea aún muy similar entre los productores, ya que no hubo mayores diferencias entre los demás atributos solo con el O-humo, y esto nos indica que el tipo de cocción es un factor muy importante en la elaboración de bacanora. Los hornos utilizados son rudimentarios sin, control de temperatura, como tampoco de la leña que se emplea en la cocción, lo que pudo ocasionar las diferencias en esta nota aromática. Se ha reportado en otras bebidas notas a humo dadas por el compuesto guaiacol (Been y Peppard, 1996; De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Molina-Guerrero *et al.*, 2007; Vera-Guzmán *et al.*, 2009). En mezcales del estado de Michoacán se han reportado diferencias sensoriales significativas con la nota ahumado y de mezcal verde, notas provenientes de la materia prima y tipo de elaboración, el cual es artesanal también (Gallardo-Valdez *et al.*, 2008).

Posteriormente los diferentes perfiles fueron analizados mediante componentes principales (CP) para reducir las dimensionalidades de los resultados obtenidos del QDA realizado por los 30 jueces del panel entrenado. Se encontraron cuatro componentes principales (CP1, CP2, CP3 y CP4) con un autovalor por arriba de 1 (Goldner y Zamora 2007). Las cuatro componentes principales que explican alrededor del 65.05 % de la varianza total de los datos obtenidos mediante el QDA

(Cuadro 2). El CP1 es una componente positiva y es un promedio de los atributos A-tufo, A-humo, A-herbáceo, A-ahumado, O-alcohol, O-tufo, O-solvente, O-humo y O-herbáceo. El CP1 sugiere que hay bebidas en el ADOB de bacanora características por estos atributos o pueden ser descritas por ellos. Muchos de estos atributos son debidos al procesamiento de la materia prima e incluso la materia prima misma, así como por el proceso fermentativo. El CP2 es una componente contrastante, ya que presenta atributos con coeficientes positivos de los atributos de A-solvente, O-tufo, O-solvente y con atributos con coeficientes negativos para los atributos de O-agave, O-ahumado y A-agave verde. Este componente sugiere que existe un grupo de bebidas de bacanora con cantidades altas de los atributos, con coeficientes positivos relacionados con el proceso fermentación y con cantidades bajas de los atributos con coeficientes negativos relacionados a la materia prima. El CP3, al igual que el componente anterior, también es contrastante, cuenta con atributos con coeficientes positivos de ST-astringente, ST-ríspido, ST-quemante y con atributos negativos de O-herbáceo y A- herbáceo.

Posteriormente se realizó un análisis de correlación entre los atributos de los perfiles encontrados con los compuestos minoritarios correspondientes a las muestras representativas para cada perfil. Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$); para el compuesto terpineol se encontró correlación con los atributos de O-agave verde (0.82) y O-solvente (0.68), este compuesto tiene como descriptor un delicado olor a flores, aceite de pino y coníferas. El compuesto 2-isopropil-2-metilfenol (carvacrol) presenta correlación con A-agave verde (0.69), A-herbáceo (0.77) y G-amargo (0.81), este compuesto ha sido descrito con las notas aromáticas de orégano y especies. El ácido decanoico presentó correlación con O-tufo (0.69), A-agave verde (0.75), G-amargo (0.94) y G-dulce (0.87), cuyos descriptores son ácidos grasos, seco, leñoso, cítrico. El ácido acético tuvo correlación con G-ácido (0.71) y su descriptor es el vinagre. El compuesto octanoato de etilo tuvo correlación con ST-quemante (0.71) y tiene como descriptor la sensación jabonosa. El compuesto 5-metoxi-fenol (guaiacol) mostró correlación con A-herbáceo (0.73), A-quemado y G-amargo (0.85)

y tiene como descriptores al humo y compuestos fenólicos. El ácido isovalérico mostró correlación con el G-amargo (0.74) descrito por el aroma a queso azul. El ácido octanoico tuvo correlación con el G-dulce (0.86) y G-amargo (0.67), cuyos descriptores reportados para este compuesto son a mantequilla rancia, lácteo, seco, rancio, duro. Finalmente, el ácido hexanoico mostró correlación con ST-quemante (0.84) y tiene como descriptores el aroma a queso y sudor (Been y Peppard, 1996; De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Molina-Guerrero *et al.*, 2007; Bellon *et al.*, 2011). Las correlaciones sugieren que los atributos sensoriales asociados con los diferentes compuestos tiene una gran participación en el aroma de esta bebida ya que al ser compuestos minoritarios pudieron ser percibidos por los jueces. En otras bebidas se ha observado que los compuestos tipo terpenos (como terpineol y carvacrol) son notas deseables de aroma y olores agradables, estos compuestos provienen del agave, es decir son parte del aroma primario. Posiblemente el guaiacol se forma durante la cocción de las piñas de agave, dando las notas aromáticas a humo, la cual tiene un gran impacto en el aroma de esta bebida, al ser el único atributo que mostró diferencias significativas (Peña-Álvarez *et al.*, 2004). El ácido acético es un compuesto que se forma desde la cocción de las piñas y sigue formándose durante la fermentación, por bacterias acéticas, como lo sugieren Vera-Gúzman *et al.* (2009). Los demás compuestos ácidos, alcoholes y esterres correlacionados con los atributos detectados por los jueces en este estudio, son resultado del metabolismo de las levaduras durante el proceso de fermentación. Sin embargo al no encontrar más atributos significativamente diferentes no se observan más compuestos claves, además de guaiacol producidos durante la fermentación.

Análisis Sensorial con Consumidores. Una vez establecidos los perfiles de bacanora y sus diferencias, éstas bebidas fueron evaluadas con consumidores. Se realizó una prueba de preferencia con ranking u ordenamiento, donde los consumidores mostraron preferencia por alguno de los perfiles. El 40% de los consumidores mostraron preferencia el perfil representado con la muestra 72 perteneciente al municipio de Huépac, seguida del perfil representado por la muestra 41 con el 33%

perteneciente al municipio de Opodepe. La muestra 71 descrita con el perfil 8 en el cuadro 1 muestra que sus valores están centralizados con respecto a los demás, es decir es una muestra balanceada con respecto a las demás, por ejemplo con el atributo de O-humo es de los perfiles que posee el valor bajo o alto y la muestra 71 está entre las del centro. El valor de esta prueba fue reforzado con una escala hedónica donde además, se obtuvieron entre los comentarios mas repetidos para la muestra mayormente preferida: que les gustaba el sabor y el aroma, lo suave, buen olor, el sabor, no era tan fuerte y con cuerpo. Sin embargo cada productor debe establecer que perfil desea para su producto, para así mejorar su proceso.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El panel entrenado pudo diferenciar ocho perfiles diferentes entre las 44 muestras procedentes del ADOB. Se describieron diversos atributos de olor, aroma, gusto y sensaciones trigeminales. Las muestras representantes de cada perfil, no mostraron diferencias en los atributos sensoriales examinados por el panel sensorial a excepción del atributo de Olor a humo. Relacionado con el tipo de elaboración, la cual es muy rudimentaria. Posiblemente no se pudieron determinar mayores variaciones significativas en los atributos por la misma variación que existe entre las muestras dentro del ADOB. Algunos compuestos están relacionados con los atributos descritos en este estudio por el panel entrenado, algunos de ellos asociados a la materia prima (agave) y otros al proceso de fermentación. Posiblemente estos compuestos tengan una participación importante en el impacto del aroma y tipicidad de esta bebida. El análisis con consumidores mostró que la muestra 72 del municipio de Huépac fue la preferida con un 41 % y se describió como una bebida suave, de buen olor y sabor y con cuerpo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Ainza M L, K A Zamora-Quiñonez, E Acedo-Félix (2009)** Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 51:58-63.
- Been, M, L T Peppard (1996)** Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:557-566.
- Bellon J R, Eglinton J M, Siebert T E, Pollnitz A P, Rose L, Lopes M B, Chambers P J (2011)** Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavor and aroma diversity to wines. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 91:603-612.
- De León-Rodríguez A, L González-Hernández, A P Barba de la Rosa, P Escalante-Minakata , M G López (2006)** Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave Salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1337-1341.
- De León-Rodríguez A, Escalante-Minakata P, Jiménez-García M I, Ordoñez-Acevedo L G, Flores-Flores J L, Barba de la Rosa A P (2008)** Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Food Technology and Biotechnology* 46(4):448-455.
- Díaz-Montaño D L, M Délia, M Estarrón-Espinoza, P Strehaiano (2008)**. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology* 42:608-616.
- Gallardo-Valdez J, Gschaedler-Mathis A C, Cházaro-Bazáñez M J, Rodríguez-Domínguez J M, Tapia-Campo E, Villanueva-Rodríguez S, Salado-Ponce J H, Villegas-García E, Medina-Niño R, Aguirre-Ochoa M, Vallejo-Pedraza M (2008)** La producción de mezcal

en el estado de Michoacán. Gobierno del estado de Michoacán, Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco A.C. P. 94-95.

Gutiérrez-Coronado M L, E Acedo-Félix, A Valenzuela-Quintanar (2007) Industria del Bacanora y su proceso de Elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(5):394-404.

Goldner MC, Zamora MC (2007) Sensory characterization of vitis vinífera cv Malbec wines from seven viticulture regions of Argentina. *Journal of Sensory Studies* 22:520-532.

Lachenmeier D, E Sohnius, R Attin, M López (2006) Quantification of Selected Volatile Constituents and Anions in Mexican Agave Spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3911-3915.

Lappe-Oliveras P, R Moreno-Terrazas, J Arrizón-Gaviño, T Herrera-Suárez (2008) Yeast associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverage. *FEMS Yeast Research* 8:1037-1052.

Mancila-Margalli N, M G López (2002) Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:806-812.

Molina-Guerero J A, J E Botello-Alvarez, A Estrada-Baltazar, J L Navarrete-Bolaños, H Jimenez-Islas, M Cárdenas-Manríquez, R Rico-Martinez (2007) Compuestos volátiles en el Mezcal. *Revista mexicana de Ingeniería Química* 6(1):41-50.

Muñoz-Rodríguez D, K Wrobel, K Wrobel (2005) Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2,3-dinitrophenylhydrazine. *European Food Research and Technology* 221:798-802.

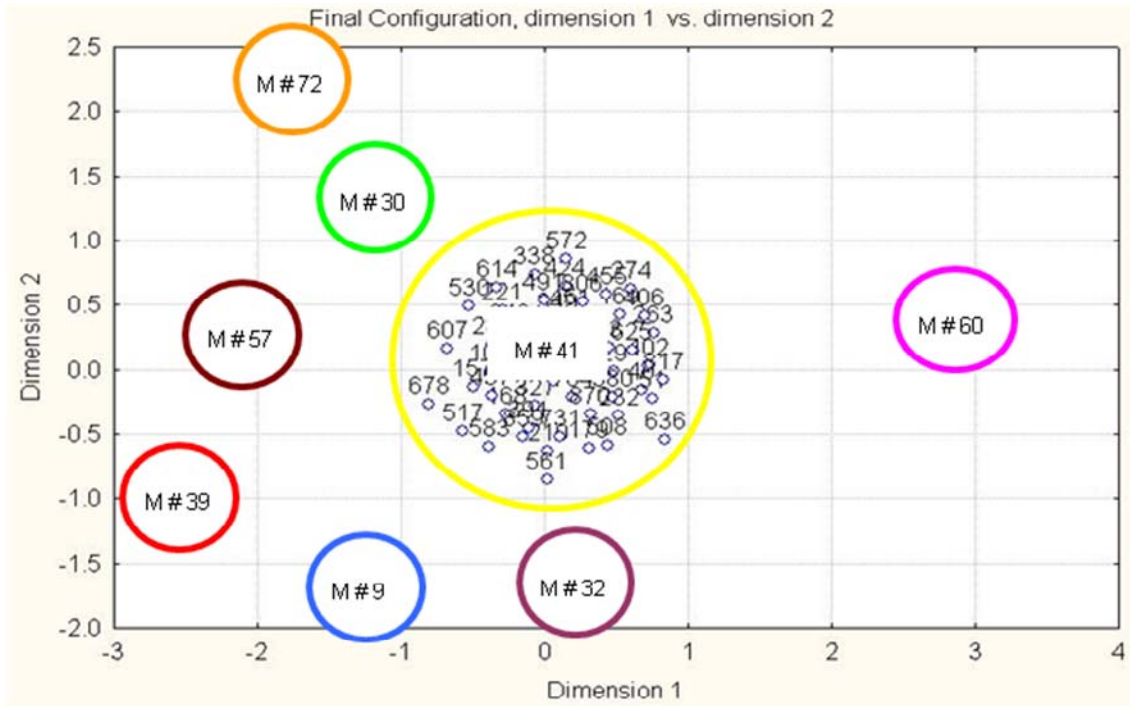
DOF (2005) Norma Oficial Mexicana, Bebidas alcohólicas-Bacanora-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado (NOM-168-SCTI-2004). Diario oficial de la Federación. www.org.mx.

Peña-alvarez A, L Díaz, A Medina, C Labastida, S Capella, L E Vera (2004) Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1027:131-136.

Vallejo-Córdoba B, A Gonzalez-Córdoba, M C Estrada-Montoya (2005) Latest advantages in the characterization of Mexican distilled agave beverage: tequila, mezcal and bacanora. AGFD-113 229th ACs meeting, San Diego, CA.

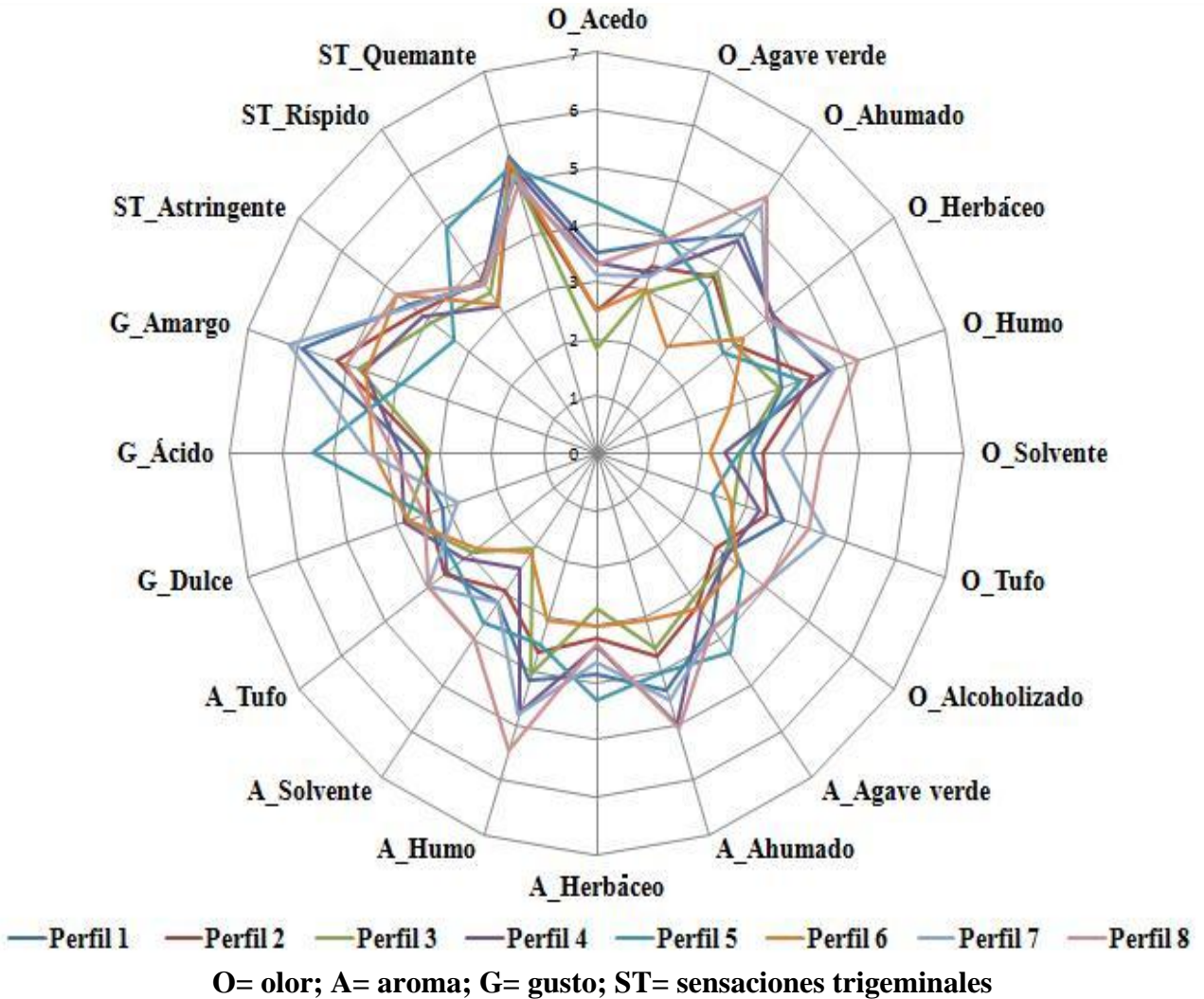
Vera Guzmán A, P Santiago García, M López (2009) Aromatic volatile compounds generated during mezcal production from *Agave angustifolia* and *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (4):273-279.

Figura 1. Análisis sensorial mediante sorting con panel entrenado de 44 muestras de bacanora de diversos municipios de ADOB.



Cada círculo representa un perfil identificado por el panel entrenado, se señala con número la muestra utilizada para los análisis posteriores al de sorting (QDA y análisis con consumidores).

Figura 2. Análisis descriptivo cuantitativo de los atributos de los ocho perfiles identificados por el panel entrenado.



Cuadro 1. Análisis de varianza de los atributos presentes en los diferentes perfiles encontrados por el panel entrenado.

Atributo	Perfil 1 (M # 9)[†]	Perfil 2 (M # 30)[†]	Perfil 3 (M # 32)[†]	Perfil 4 (M # 39)[†]	Perfil 5 (M # 41)[†]	Perfil 6 (M # 57)[†]	Perfil 7 (M # 61)[†]	Perfil 8 (M#72)[†]	EEM
O-acedo	3.05	2.22	2.56	3.26	3.0	2.33	2.82	1.37	0.10
O-agave verde	3.72	3.28	3.12	3.96	3.33	2.92	3.56	2.86	0.36
O-Ahumado	4.60 ^a	3.64 ^{ab}	2.02 ^a	5.05 ^b	4.21 ^{ab}	4.82 ^b	5.19 ^b	3.77 ^{ab}	0.40
O-herbáceo	3.95	3.04	3.54	3.99	4.14	3.75	4.53	3.13	0.37
O-humo	3.49	4.15	2.76	4.80	4.30	4.19	4.35	3.52	0.38
O-solvente	2.77	2.64	2.23	3.77	2.43	3.24	4.03	2.66	0.
O-tufo	3.52	3.17	2.41	3.90	2.86	4.36	3.21	2.52	0.43
O-alcohol	2.75	2.58	3.41	3.90	3.07	3.68	3.94	2.96	0.39
A-agave verde	3.59	3.12	3.25	3.71	3.36	3.51	3.33	3.11	0.36
A-Ahumado	4.25	3.59	2.96	4.71	4.28	3.92	4.24	3.56	0.38
A-herbáceo	3.65	3.00	3.12	3.26	3.36	3.37	4.32	2.70	0.36
A-humo	3.99	3.42	3.16	2.37	3.99	3.85	4.32	3.65	0.38
A-solvente	2.60	2.29	2.18	3.94	2.49	2.91	3.75	2.05	0.36
A-tufo	3.31	2.92	2.47	3.50	2.72	3.70	3.23	2.51	0.41
G-dulce	2.83	3.12	3.25	3.38	3.45	2.43	3.71	3.80	0.37
G-amargo	5.82	5.12	4.51	4.75	4.65	6.06	5.53	4.78	0.34
G-ácido	3.38	3.15	4.13	3.84	3.73	4.13	2.85	3.17	0.34
ST-astringente	3.92	3.62	4.45	4.40	4.07	4.11	4.35	3.87	0.38
ST-ríspido	3.08	3.18	2.85	2.91	3.18	3.40	3.42	3.12	0.38
ST-quemante	5.34	5.01	4.87	4.89	5.30	5.42	5.7	5.28	0.36

EEM: error estándar de la media; O= olor; A= aroma; G= gusto; ST= sensaciones trigeminales; medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05); [†]: número de muestra que representa a ese perfil.

Cuadro 2. Análisis de componentes principales de los atributos de los diferentes perfiles encontrados por el panel entrenado.

Componente	Autovalor	% de Varianza explicada	% de Varianza explicada acumulada
CP1	9.09	43.33	43.33
CP2	1.82	8.69	52.02
CP3	1.52	7.25	59.28
CP4	1.21	5.79	65.07
Total	13.64		65.07

CAPÍTULO 4

Selection of native yeast for the Bacanora production

Alvarez-Ainza, Maritza Lizeth¹; Zamora-Quiñonez, Karina Alejandra¹; González-Ríos, Humberto²; de la Torre, Mayra¹; and Acedo-Félix, Evelia^{1*}

¹ Coordination of Food Science

² Coordination of Technology on Food of Animal Origin

Research Centre for Food and Development, A. C. Road to Victoria Km

0.6. C. P. 83000, P.O. Box. 1735 Hermosillo, Sonora, México. Phone and Fax number:

+(52) 6622892100 Ext. 224.

*Corresponding author: Evelia@caid..mx (E. Acedo-Félix)

Preparado conforme el formato de envío para la revista:
Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

Selection of native yeast for the Bacanora production.

Alvarez-Ainza, Maritza Lizeth¹; Zamora-Quñonez, Karina Alejandra¹; González-Ríos, Humberto²;
de la Torre, Mayra¹; and Acedo-Félix, Evelia^{1*}

¹ Coordination of Food Science

² Coordination of Food Science of Animal Origin

Research Centre for Food and Development, A. C. Road to Victoria Km 0.6. C. P. 83000, P.O. Box.
1735, Hermosillo, Sonora, México. Phone and Fax number: +(52) 6622892100 Ext. 224.

* Corresponding author: evelia@ciad.mx (E. Acedo-Felix)

mlizeth_aa@yahoo.com (M. Alvarez-Ainza)

1 ABSTRACT

2 Bacanora is a Mexican distilled beverage made from agave, similar to tequila, mezcal and sotol, with
3 organoleptic characteristics that vary highly from producer to producer, because their traditional methods of
4 production. The aim of this study was to select native yeast involved in the artisanal process of fermentation
5 to produce Bacanora beverage. We perform an initial pre-selection based upon the phenotypic characteristics
6 of 580 strains of yeast, and then, based in the fermentation characteristics, to select some strains which satisfy
7 with desirable characteristics for the fermentation of sugars from the *Agave angustifolia* Haw. Three strains of
8 *S. cerevisiae* and three yeast non-*Saccharomyces* were evaluated in mixed culture. As expected,
9 *Saccharomyces* yeasts, produced at the end of the fermentation 8.27 ± 0.24 g/L of biomass, 25.51 ± 1.19 g/L
10 of ethanol, with a volumetric productivity of ethanol production of 1.76 ± 0.17 g/L/h, while the strains non-
11 *Saccharomyces* the parameters were 3.86 ± 1.14 g/L, 15.56 ± 1.68 g/L and 0.484 ± 0.06 g/L/h respectively. The
12 yeast who dominated the course of the fermentation at the end of each culture was determined by PFGE and it
13 was found that in the mixed culture using three strains of *S. cerevisiae*, all were found at the end, but one of
14 them predominates, the yeast with the key 1101. In the mixed culture of non-*Saccharomyces* yeasts,
15 *Torulaspora delbrueckii* was the predominant yeast. The results showed that the native yeasts are adapted at
16 the agave juice used in the fermentation for Bacanora and the results obtained with the *S. cerevisiae* species
17 were better than the produced of Bacanora at the present obtained. The combined use which the predominant
18 *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts will introduce an important and positive impact in the process
19 and yields.

20 Keywords: Bacanora, Alcoholic fermentation, native yeast, mixed cultures.

21 INTRODUCTION

22 Bacanora is a Mexican distilled beverage made from agave, similar to tequila, mezcal and sotol, with
23 organoleptic characteristics that vary highly from producer to producer, because their traditional methods of
24 production. According to the Official Mexican Standards for Bacanora, the drink should be made only from
25 *Agave angustifolia* Haw and in the Denomination of Origin Bacanora (ADOB) [1, 28]. The process is similar
26 that of mescal, sotol and tequila. First the agave core is cooked in ovens with mezquite-wood, to hydrolyze

27 the inulin, then cores are milling to obtain the must named “saite” and it is fermented by native yeasts. Finally
28 fermented agave must is distilled and standardized b the particular touch of each producer [1, 26, 10, 30, 35].
29 From the Mexican agave distilled beverages (tequila, mezcal, sotol and bacanora), only the tequila batches
30 keep a constant sensorial quality, because it is produced in large technificaty facilities. While mezcal, sotol
31 and bacanora have large variations in sensory quality, since they are produced using artisanal process, even
32 more mezcal, is made of different types of agave, not only from one species like sotol, tequila and bacanora
33 [27, 29]. In addition the fermentation is spontaneous that it is drive by the combined action of various species
34 of yeasts and bacteria and the species and species ratio change during the fermentation, dominating at the end
35 *S. cerevisiae* [21]. Also in the tequila industry, most companies use spontaneous fermentation, in many cases
36 by ignoring the benefits of using a yeast inoculums or by the policy of the company of keeping a natural
37 fermentation. In case of using yeast, Tequila companies use different strains of *S. cerevisiae*. Which generally
38 are yeasts for wine, beer or whisky fabrication and even bakery yeast, which although they are able to ferment
39 the tequila must, they are not the best suited to carry out this process [18].

40 It was observed that the typical quality and reproducibility of wine, has required the use of starter
41 cultures. However, although there are commercial yeasts for fermentation, is more effective the use of pure
42 cultures of yeasts from the same area where they will be used. It is believed that these yeasts called selected
43 local yeast are better, because they are completely adapted to the climatic conditions and the raw material, ie
44 the must to ferment and they are responsible for at least part of the unique characteristics of the beverage [21,
45 31]. It is important the native yeasts selection because they has different fermentation characteristics and it
46 was observed that despite the use of native yeasts, it is possible to obtain products of varying quality. Wondra
47 and Berovic [34], evaluated 29 native strains of *Saccharomyces cerevisiae* during wine making and found that
48 only one of these strains produced an excellent wine and 11 wines hah not good quality. The main phenotype
49 characteristics desirable to select a yeast as inoculum, are that they resist adverse factors such as high
50 concentrations of ethanol, low pH. In addition other desirable characteristic are a short lag phase, complete
51 consumption of fermentable sugars, glycerol and production of killer toxin. On the other hand productions of
52 undesirable characteristics are production of H₂S, volatile acids and some of intermediate metabolites like
53 acetaldehyde and pyruvate [21].

54 It was observed, in several studies, that the species and the strains of the yeast involved in
55 fermentation processes are different, even in the fermentations performed with a started culture [11]. Heart &
56 Fleet [19] assessed the evolution of some wines fermentation that were inoculated with *S. cerevisiae*, this
57 yeast dominated the fermentations course, but there was significant growth of other non-*Saccharomyces* yeast
58 species like *Kloeckera*, *Candida* y *Hansenula*. Lachance [20] identify various species of yeast, at different
59 points in the Tequila production like *S. cerevisiae*, *Hanseniaspora*, *Pichia kluyveri* y *Candida krusei*.
60 Arellano et al. [2] evaluated the kinetic parameters and the formation of volatile compounds from native
61 strains of *S. cerevisiae* and *Kloeckera sp* isolated from agave juice for the tequila production and observed that
62 strains of *S. cerevisiae* behavior similar, and also *Kloeckera* species. However between these species, the
63 production of aromatic compounds was different.

64 These results support the idea that both species play an important role in the fermentation process for
65 the tequila production so they recommended the evaluation of mixed cultures. The objective of this work is to
66 select native yeast of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains isolated during the alcoholic
67 fermentation process of bacanora production and evaluated the best yeast as started culture in the fermentation
68 of *Agave angustifolia* Haw. juice for production of bacanora.

69

70 MATERIALS AND METHODS

71 **Yeast Strain.** 205 strains of *S. cerevisiae* and 375 strains no-*Saccharomyces* yeast isolated from fermentation
72 tank bacanora-cultures in Sonora, México were used (Collection of the laboratory of Microbiology in the
73 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México). The yeasts were stored
74 at -70 °C in a YEPD medium (yeast extract 10g/L, peptone 20g/L and dextrose 20g/L) and 30% of glycerol.

75 **Phenotypical characteristics of yeast.** Utilization of 1% of glucose, fructose and inulin was assessed
76 according to García-Galaz et al. [15]. Growth at 37 and 42 °C was evaluated in PDA (Potato Dextrose Agar,
77 Difco) plates acidified with tartaric acid 10%, and incubated 48 h [7]. Tolerance to ethanol was evaluated
78 according to Lachance [20], using 3, 5, 8, 10, 15 and 20% of ethanol. Growth at different pH was evaluated
79 on PDA plates, pH was adjusted with tartaric acid in a pH range from 2.5 to 7.5 in increments of 0.5 and

80 incubated at 30 °C for 48 h. The determination of H₂S production was performed by inoculating the strains on
81 plates of Bismuth Sulfite Agar (Difco) and incubating for 5 days at 30 °C [5]. Killer factor was also evaluated
82 using reference of killer-sensitive strain CECT 1018 and the Killer strain CECT 1891 [6, 32]. Yeast were
83 cultivated in YEPD broth 1.8 % of fructose was used in stead of glucose, absorbance at 600 nm was follow
84 until stationary phase please was reached and from the growth kinetic the length of the lag phase was
85 determined. The analysis of phenotype characteristics were conducted by BioNumerics software (Applied
86 Maths 1998-2002), using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arimetic Mean) and the DICE
87 coefficient.

88 **Evaluation of mixed cultures as starter for bacanora production**

89 Inoculum. *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrucekii*, *Pichia membranefaciens*
90 and *Kluyveromyces marxianus*) with the best phenotype characteristics were evaluated. Each of yeast were
91 inoculated in the fermentation medium, to obtain the pre-inoculum and the inoculum, the agave juice was
92 incubated by 12 h at 30 °C with low stirring (200 rpm). Two inoculums were used ones with three strains of
93 *S. cerevisiae* (key 46, 591 and 1101) and another with three species of non-*Saccharomyces* (*Torulaspora*
94 *delbrucekii* key 1227, *Pichia membranefaciens* key 807 and *Kluyveromyces marxianus* key251)

95 Fermentation. Juice from *Agave angustifolia* Haw filtered and sterilized was used, the sugar
96 concentration was adjusted at 12°Brix (55±3 g/L reducing sugars). The agave juice was supplemented with
97 ammonium sulfate (1g/L). Fermentations were carried in 3L bioreactor (Applikon, The Netherlands) at 30 °C
98 and 200 rpm, using 2.5 L of the agave juice and no-aeration. Yeast were inoculated to an initial concentration
99 of 2×10^7 cells/mL. Two fermentations were performed for each culture. The fermentation course was follow
100 for 24 h and sampling was performed every hour during the first 12 h and every 2 hours the remaining 12
101 hours. The kinetic parameters specific growth rate (μ), substrate consumed rate (r_s), ethanol production rate (r_p),
102 biomass, ethanol yield ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$) as well as a maximal biomass production (X) were evaluated using the
103 statistical package NCSS 2007 (Kaysville, Utah, USA).

104 Analytical methods. Biomass concentration was estimated by total count using a neubauer chamber
105 and dry weighth. Total reducing sugar were determinate in previously hydrolyzed ferment must free of yeast by

106 DNS method [24]. Viability was estimated after dying cells with methylene blue [9]. Ethanol concentration
107 was determined using an enzymatic method measurement in a YSI biochemical analyzer 2700 (Yellow Spring
108 Instrument). Karyotype technique was determined by pulsed clamp electrophoresis (PFGE) according to
109 Bruzanello et al. [4] with some modifications using zymoliase-20T (25 µg/mL, Seikaguru Corporation).
110 *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 was used as molecular weight (Molecular Weigh log Biolabs Inc.). The
111 gel was stained with ethidium bromide and photograph with a GelDoc camera (BioRad).

112

113 RESULTS

114 All *S. cerevisiae* strains ferment glucose and fructose but only the 43% (88 strains) ferment inulin.
115 8.2% of the non-*Saccharomyces* yeast did not ferment glucose, 7.4 % were unable to ferment fructose and
116 57.3% could use inulin. 94% of the *S. cerevisiae* strains were able to grow at 37 °C and 64% at 42 °C, for the
117 non-*Saccharomyces* yeast 97.4% were able to grow at 37 °C and 95.8 % at 42 °C. All the yeast were able to
118 grow and resist ethanol concentrations from 3-15% and the 95% of *S. cerevisiae* yeast were able to resisted
119 20% ethanol and 95.7% of the non-*Saccharomyces* strains. Only 8 strains of *S. cerevisiae* strains were unable
120 to grow at pH 2.5 and 170 non-*Saccharomyces* strain were also unable. 17% of the yeasts *S. cerevisiae* were
121 able to produce H₂S and the 16.5% of non-*Saccharomyces* yeast. The killer phenotype was present only in
122 three *Saccharomyces* yeasts, in 14 were killer-sensible and in 257 were killer-neutral.

123 The Figure 1 show the results of the analysis performed by the BioNumerics program, where the
124 coefficient Dice and UPGMA were used to obtain a dendrogram and it can observed a group or cluster with
125 the suitable characteristics recommended by Alvarez-Ainza et al. [1] for the Bacanora production. This group
126 is the cluster 8 and is constituted by 40 yeasts, 30 of *S. cerevisiae* and 10 of non-*Saccharomyces*. After of the
127 analysis of the phenotypic characteristics the analyses of the growth curves were done. These analysis show
128 that the latency phase were diverse in the different kind of yeast, where the non-*Saccharomyces* show
129 latencies phases until of 5 hours and the *S. cerevisiae* strains no more than 2.5 h. These results help to
130 determinate the yeasts that are adapted to the medium with fructose, fermentable carbohydrate present in the
131 agave juice (data no shown).

132 Later three non-*Saccharomyces* yeasts, with the phase of latency minor to 2 h and different velocity
133 of grow were chosen to evaluate in mixed cultures. Likewise 3 different species of non-*Saccharomyces* were
134 chosen to be evaluated in mixed cultures: *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranefaciens* y *Toluraspora*
135 *delbrueckii*.

136 The evolution of biomass, reducing sugar consumption and the production of ethanol with respect to
137 time, using the mixed cultures was plotted in Figure 2. Table 1 shows the kinetic parameters and the changes
138 in fermentation of each mixed culture. The development of the mixed cultures with *Saccharomyces* strains
139 was different at the mixed culture using non-*Saccharomyces* strains. The *Saccharomyces* strains grew faster
140 and in greater numbers than the non-*Saccharomyces*, which yielded the final biomass of 8.275 ± 0.24 g/L and
141 the direct reducing sugars, were consumed at 18-20 h of fermentation. Moreover, the mixed culture using the
142 non-*Saccharomyces* strains was slower and yielded a maximum rate of biomass produced from 3.8687 ± 1.14
143 g/L and at 24 h the sugar levels have not been consumed entirely. On the other hand the ethanol production,
144 from the *Saccharomyces* strains were more efficient than non-*Saccharomyces*, where at the end of
145 fermentation the first one were able to produce 25.51 ± 1.19 g/L with an ethanol, with a production rate of
146 1.76 ± 0.17 g/L/h. While non-*Saccharomyces* strains produced 15.56 ± 1.68 g/L of ethanol with a maximum
147 rate production of 0.484 ± 0.06 g/L/h.

148 The technique of PFGE helps to found the yeasts strains that were dominating at the end of the
149 fermentation. Figure 3 show the karyotypes founded in the different cultures used. In mixed culture using *S.*
150 *cerevisiae* the strain with the key 1101 was the predominant at the end, but the other strains of *S. cerevisiae*
151 were not inhibited in the process. The three *S. cerevisiae* strains used in this culture were able to grow at the
152 end and were identifying by their chromosomal profile. When the non-*Saccharomyces* strains were used in
153 the cultures, the strain predominant were the specie of *Torulaspora delbrueckii*, and occasionally were
154 isolated some strains of *Kluyveromyces marxianus*.

155 **DISCUSSION**

156 The fermentation of carbohydrates were performed in order to assess the ability of yeast strains to
157 use these sugars in anaerobic conditions, since fermentation process takes place down under anaerobic

158 conditions [33]. We assessed glucose, fructose and inulin, as in theory these are the sugars in the juice of
159 agave for the production of Bacanora, because when cooked agave “piñas” hydrolyzes the carbohydrate
160 reserve, are that the predominating with other no identified fructans. In the fermentation broth or “saite” the
161 largest concentration is of fructose, and glucose only slightly since the inulin is a fructan-type polysaccharide,
162 which consists of 20 to 60 monomers of fructose, and glucose units terminal, which can be separated either
163 enzymatic or heat treatment. In the Bacanora process is by a thermal treatment, however during the cooking
164 process cannot hydrolyze all the inulin present in the “piñas”, therefore also we assessed whether these yeast
165 strains ferment inulin.

166 The tolerance or ability to grow at 37 and 42 °C was tested in base to the reports for the fermentation
167 of Tequila and whisky. Optimum temperature for yeasts growth is 35 °C, but this temperature may increase
168 during the process from 2 or 3 degrees and in summer, it has been observed that process reaches until 40 °C
169 for Tequila fermentation [16]. In the development of production of Bacanora, we can take into account the
170 weather conditions in the region to select yeasts; they will be more thermotolerant so that temperatures from
171 the region evidence that was up to 42 °C. The ability for ethanol tolerance of yeast was performed by the
172 recommendations of Lachance [20] in that work, most of the *Saccharomyces* strains resisted until 11%
173 ethanol, and in the present work almost all the yeasts resist the 20%.

174 Moreover, in musts fermented of cane juice and agave are achieved between 4 and 6.5% ethanol, so
175 the native strains involved in the process of developing Bacanora have this great quality [18]. The pH of the
176 must in most cases is around 5 and 6, in some cases lower [14], so in this study we determined the survival of
177 yeast at different pH. Moreover, also evaluated the production of H₂S on each of the strains, it has been
178 observed during fermentation, that this feature is a disadvantages in the wine aroma [5, 21]. It has not been
179 reported whether this feature can affect the final alcoholic beverages like wine. In Bacanora process we did
180 not found some information, but was taken into account because during the fermentation the broth may
181 deteriorate and cause unwanted odors and flavors. Some visited producers commented about the sulfur aroma
182 (rotten eggs) of the “saite” in fermentation, producing economic losses because “saite” is dismissed (personal
183 communication). Killer phenotype may represent a mechanism of antagonism between yeasts during
184 spontaneous fermentation process [6, 32]. The native populations may be a relatively high number of killer-

185 resistant strains to the toxin and low presence of strains with killer-killer phenotype. Moreover killer native
186 populations in a given area could put in interrogative the inoculation of a killer-sensitive strain selected for
187 observe its best oenological characteristics. It is then recommended to select those strains that show the killer-
188 neutro o killer-killer phenotype, because it favors when are used as starter culture [32].

189 Of the group of 580 strains isolated, currently have 40 strains that meet these characteristics, as
190 shown in Figure 1. By the analysis in BioNumerics software it is shown the percentage of similarity among
191 the phenotypic characteristics of *S. cerevisiae* strains. Dendrogram shows 28 groups or clusters from which
192 the cluster 8 is the most interesting for the fermentation of Bacanora, as is the group of strains that have
193 desirable characteristics for the development process of Bacanora. These characteristics are that ferment three
194 carbohydrates tested, grow up to 42 °C and low pH (2.5), tolerate high concentrations of ethanol (20%) and
195 possess the killer or neutral phenotype [1].

196 The kinetic parameter evaluated obtained in the fermentations, indicate the degree of adaptation of
197 the microorganisms to the culture and if they are adapted to it. In this study the yeasts in mixed cultures were
198 able to grow and achieve a transformation of sugars into ethanol, similar results were reported by Arellano et
199 al. [2]. Should be noted here that in the case of mixed cultures there is also a competition between the
200 inoculated strains and the best adapted will be the predominant. In the study made by Arellano et al. [2] the
201 species of *S. cerevisiae* and *Kloeckera sp* strains were used in monocultures. Our results are different with the
202 reported by Di Serio et al (2003) who evaluated baker yeast on YEPD medium and other medium made with
203 molass and different salts. The values reported by Di serio et al [8] of the maximum growth rate and the rate
204 of biomass yield per substrate consumption are bigger than our results. This means that the medium YEPD
205 and the molass are more completed than the agave juice or the agave juice has some kind of inhibitors that
206 affect the yeast, like some maillard compounds produced in the cooking of the agave, like the furfural. On the
207 other hand the results obtained are encouraging because the producer of Bacanora obtained less than 20 g/L of
208 ethanol in their fermentations.

209 According to the data obtained from the culture of non-*Saccharomyces* strains, these yeasts are less
210 efficient in fermentations, because they are more susceptible than *Saccharomyces* strains, possible they are

211 affected by nutritional limitations and vitamins, which are loss during cooking of the “piña” due to
212 degradation by heat and/or toxic compounds such as ethanol and some other. The strains of *Saccharomyces*
213 and non-*Saccharomyces* that prevailed at the end in each culture, must share similar phenotypic
214 characteristics. Possibly these are more adapted to the conditions of the agave juice that becomes increasingly
215 hostile, by the concentrations of ethanol or toxic compounds that can be found as well as the limitations of the
216 medium [19]. It is reported that non-*Saccharomyces* species are often found in alcoholic fermentations of
217 different products, in wine are reported that the participation of non-*Saccharomyces* yeast have an important
218 impact in the final aroma. And also has been observed that the species used in this study like *Torulaspora*
219 *delbrueckii* can be used to improve products modulating sensory parameters such as acidity [3].

220 **CONCLUSIONS**

221 The phenotypic characteristics of 580 native yeasts were evaluated. 40 yeasts count with the suitable
222 phenotypic characteristics for the Bacanora production. The native *S. cerevisiae* present more adaptation at
223 medium with fructose than the native yeast of non-*Saccharomyces*. The kinetic parameters measured show
224 that the yeast probed was allowed to grow in the agave juice. The native yeast was not inhibited by the toxins
225 that the medium could be have. The biomass and the maximum rate of sugar consumption as an indication of
226 adaptation to the agave juice (the raw material) as have been reported in the must of Tequila. Taking into
227 consideration the operating conditions of fermentation of a Tequila industry, the results are encouraging
228 because they were similar to those reported in other studies, and a best yield of ethanol was obtained than the
229 artisan producers who make Bacanora. The combined use of these predominant yeasts will be present an
230 important positive impact in the process and also in the aroma of the final product.

231 **ACKNOWLEDGEMENTS**

232 We would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, (CONACyT) for the
233 scholarship to M. Alvarez-Ainza that made this work possible. The authors also thank Fundación Produce,
234 Sonora and the producers involves in the Bacanora production.

235

236 REFERENCES

- 237 1. Alvarez-Ainza ML, Zamora-Quiñonez KA, Acedo-Félix E. (2009) Perspectivas para el uso de
238 levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. Rev Latinoam Microbiol 51:58-63.
- 239 2. Arellano, M., C. Pelayo, J. Ramírez & I. Rodríguez. 2008. Characterization of kinetic parameters and
240 the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from
241 agave juice. J Ind Microbiol Biotechnol 35:835-841.
- 242 3. Bely M, Stoeckle P, Masneuf-Pomarède I, Dubourdieu D. (2008). Impact of mixed *Torulasporea*
243 *delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. Int J Food Microbiol
244 122(3):312-320.
- 245 4. Bruzanello C, Horii J, Pizzirani-Kleiner A (1999). Charaterization of fusión products from protoplast
246 of yeast and their segregants by electrophoretic karyotyping nad RAPD. Rev Microbiol 30:71-76.
- 247 5. Caridi A, Cufari A, Ramondino D (2002). Isolation and clonal pre-selection of enological
248 *Saccharomyces*. J Gen Appl Microbiol 48:261-267.
- 249 6. Ceccato-Antonini S, Tosta C, da Silva C (2004). Determination of yeast killer activity in fermenting
250 sugarcane juice using selected ethanol-making strains. Braz Arch Biol Technol 47:13-23.
- 251 7. Combina M, Elia A, Mercado L, Catania C, Ganga A, Martinez C (2005). Dynamics of indigenous
252 yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int J Food
253 Microbiol 99:237-243.
- 254 8. Di Serio M, Tesser R, Santacesaria E. (2003) A kinetic and mass transfer model to simulate the
255 growth of baker's yeast in industrial bioreactors. Chem Eng J 82(1-3):347-354.
- 256 9. Díaz-Montaña, DM, Délia ML, Estarrón-Espinoza M, Strehaiano P (2008) Fermentative capability
257 and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. Enzym
258 Microbial Tech 42:608-616.
- 259 10. De la Cruz C (2003) Sembrar maguey y producir Bacanora en el rancho. Rev Rancho 11:22-23.
- 260 11. Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán M, García-Maiquez E, Uruburu F, Querol A (2001). Yeast
261 populations dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. Appl Environ
262 Microbiol 67(5):2056-2061.

- 263 12. Fiore C, Arrizon J, Gschaedler A, Flores J, Romano P (2005) Comparison between yeasts from grape
264 and agave must for traits of technological interest. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1141-1147.
- 265 13. Fleet, G. (2008). Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Research* 8(7):979-995.
- 266 14. Frazier W, Westhoff D (1998) *Microbiología de los Alimentos*. España. Ed. Acribia, S.A. pp.174-
267 175.
- 268 15. García-Galaz A, Pérez-Morales R, Díaz-Cinco M, Acedo-Félix E (2004). Resistance of *Enterococcus*
269 strains isolated from pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against *Escherichia coli*
270 K88. *Rev Latinoam Microbiol* 34:5-11.
- 271 16. Guillamón J, Sabate J, Barrio E (1998) Rapid Identification of wine yeast species base don RFLP
272 analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol* 169:387-392.
- 273 17. Gutiérrez-Coronado ML, Acedo-Félix E, Valenzuela-Quintanar A (2007) Industria del Bacanora y su
274 proceso de Elaboración. *Cienc Tecnol Aliment* 5(5):394-404.
- 275 18. Gschaedler MAC, Ramirez CJJ, Díaz MDM, Herrera LJE, Arellano PM, Arrizón GL, Pinal ZL.
276 (2004). CIATEJ. Fermentación etapa clave en la elaboración de tequila, Capitulo 4. En *Ciencia y*
277 *tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. In: Gschaedler MAC (ed) Centro de investigación y
278 asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco. Pp. 62-120.
- 279 19. Heard G, Fleet G (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines.
280 *Appl Environ Microbiol* 50(3):727-728.
- 281 20. Lachance MA (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van*
282 *Leeuwenhoek J* 68:151-160.
- 283 21. Mas A, Torija M, Beltrán G, Novo M, Hierro N, Poblet M, Rozés N, Guillamón J (2002). Selección
284 de Levaduras. *Tecnología del vino, Fermentos*. 39-44. <http://www.alcion.es>
- 285 22. Mathews C, Van Holde K (2000) *Bioquímica*. 2ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana. pp. 495-
286 511.
- 287 23. Mesas JM, Alegre MT (1999) El papel de los microorganismos en al elaboración del vino. *Cienc*
288 *Tecnol Aliment* 2(4):174-183.
- 289 24. Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt*
290 *Chem* 31:426-428.

- 291 25. Mills D, Johannsen E, Cocolin L (2002) Yeast diversity and persistence in botrytis-afeccted wine
292 fermentations. *Appl Environ Microbiol* 68(10):4884-4893.
- 293 26. Moreno S (1998). *Agave angustifolia*. El bacanora desde su origen hasta nuestros días. Una bebida
294 sonorensis con calidad internacional. Instituto del medio ambiente y el desarrollo de Sonora (Imades).
295 *Rev Entorno* 2:3-5.
- 296 27. NOM-070-SCFI-1994 (1998) Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-
297 mezcal-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. In *Diario Oficial de la Federación*,
298 México, D.F. www.ctr.org.mx
- 299 28. NOM-168-SCTI-2004 (2005) Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCTI-2004, Bebidas alcohólicas-
300 Bacanora- especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. In *Diario oficial de la Federación*,
301 México, D.F. www.ctr.org.mx.
- 302 29. NOM-006-SCFI-2004 (2004) Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-
303 tequila-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. In *Diario oficial de la Federación*,
304 México, D.F. www.ctr.org.mx.
- 305 30. Núñez, L. (2001). La producción de mezcal Bacanora. Centro de Investigación en Alimentación y
306 Desarrollo, A.C. Pp.226
- 307 31. Querol A, Fernández-Espinar M, del Olmo M, Barrio E (2003) Adaptive evolution of wine yeast.
308 *Int J Food Microbiol* 86:3-10.
- 309 32. Rodríguez L, Abad D, Gómez J, Casanova J, Lema C (1998) Fenotipo killer: Distribución en la
310 comarca de la Ribiera sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. *Cienc Tecnol Alimen*
311 2:33-37.
- 312 33. Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caraso M, Capece A (2003) Function of yeast species and strains in
313 wine flavor. *Int J Food Microbiol* 86:169-180.
- 314 34. Wondra M, Berovic M (2001) Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by
315 different yeast strains. *Food Technol Biotechnol* 39(2):141-148.
- 316 35. Yanez G (2003) El maguey de Bacanora (*Agave angustifolia*). Instituto del medio ambiente y el
317 desarrollo de Sonora (Imades). *Rev Entorno* 11:5-

Figure 1 Dendrogram of the phenotypic characteristics of the yeast of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* obtained by the BioNumerics program, where the coefficient Dice and UPGMA.

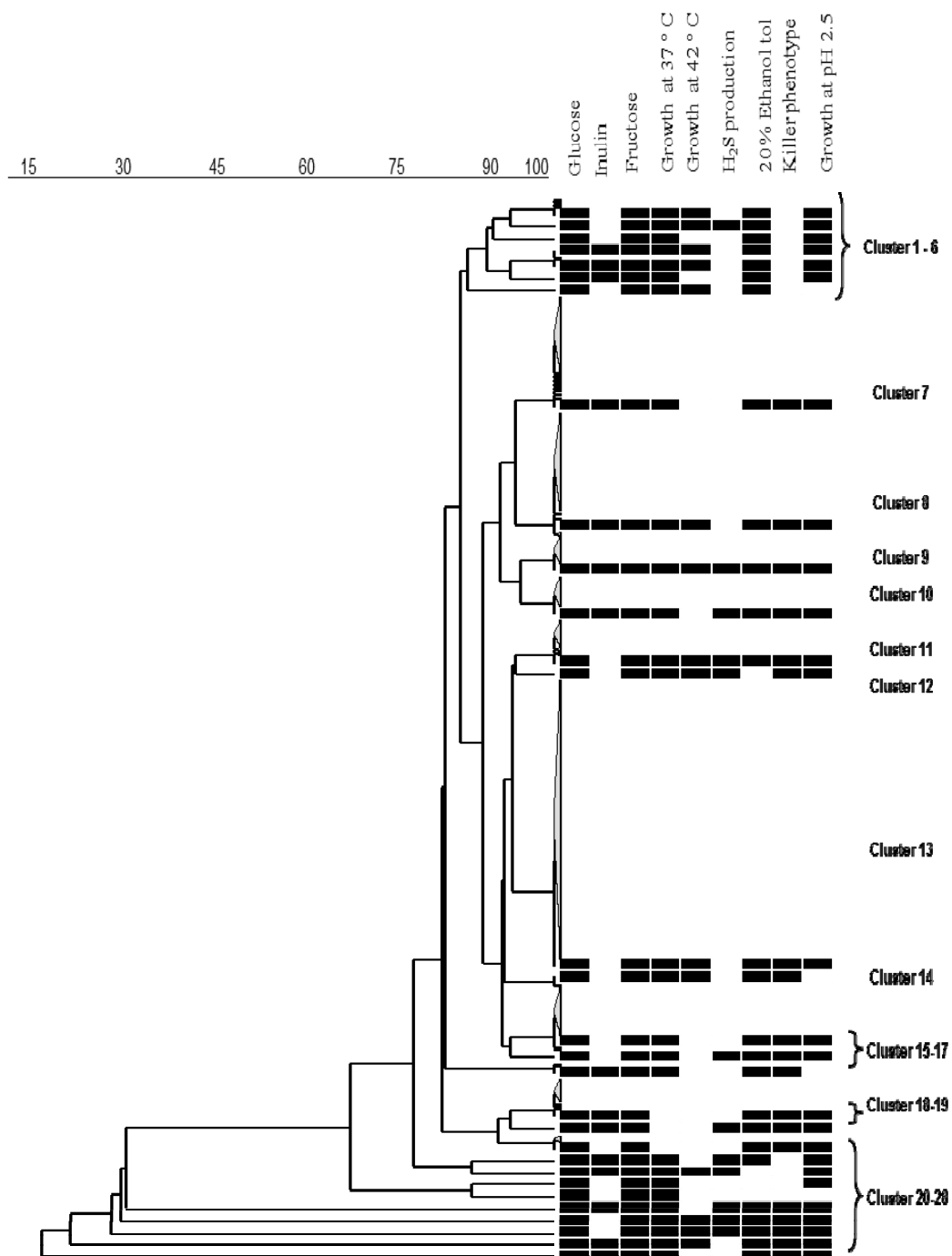


Figure 2 Kinetic profiles of the fermentation of the cultures with *S. cerevisiae* (□) and non-*Saccharomyces* (■) ARD: reduction sugar concentration profile; Ethanol: ethanol concentration profile; Biomass: biomass concentration profile.

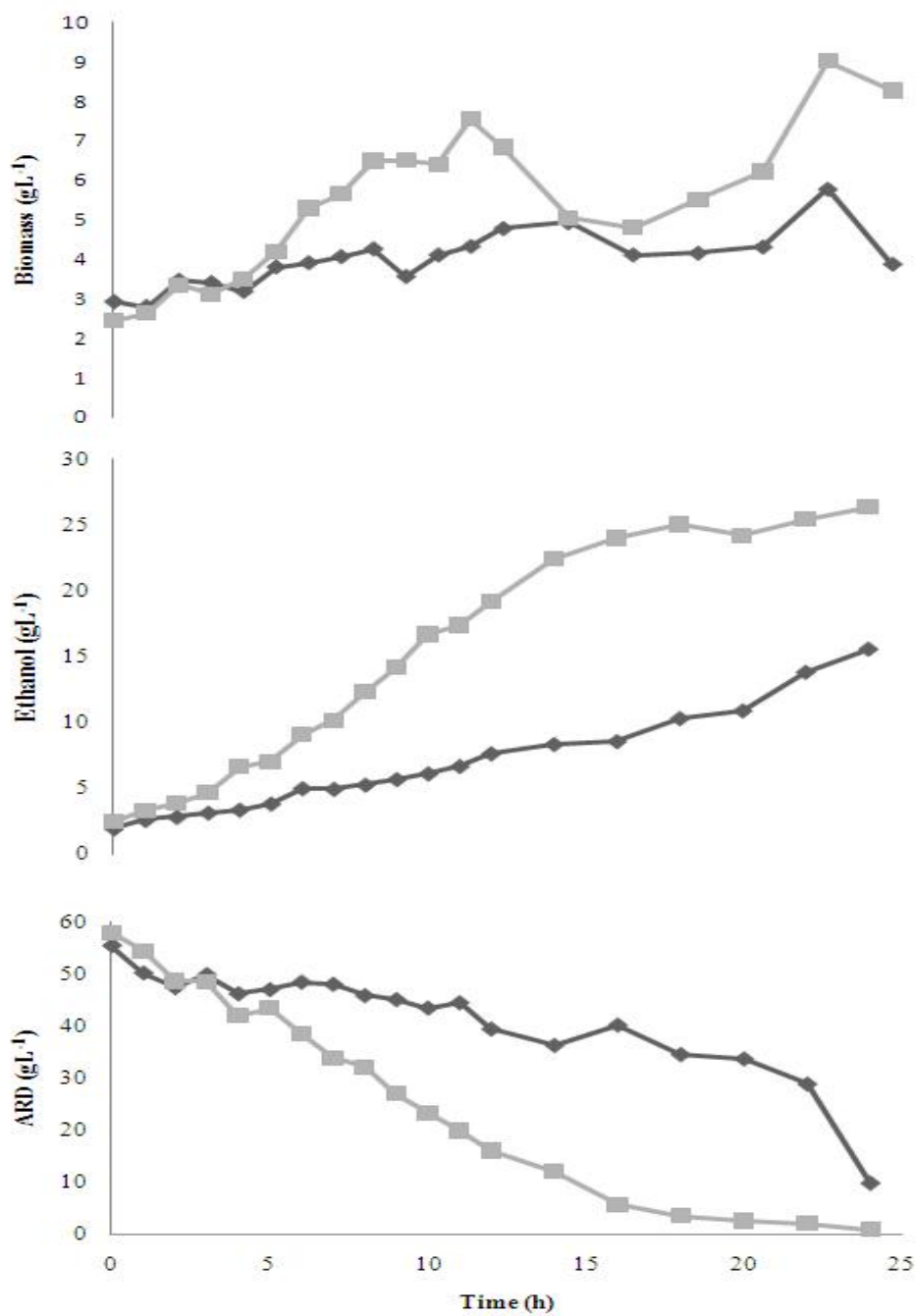
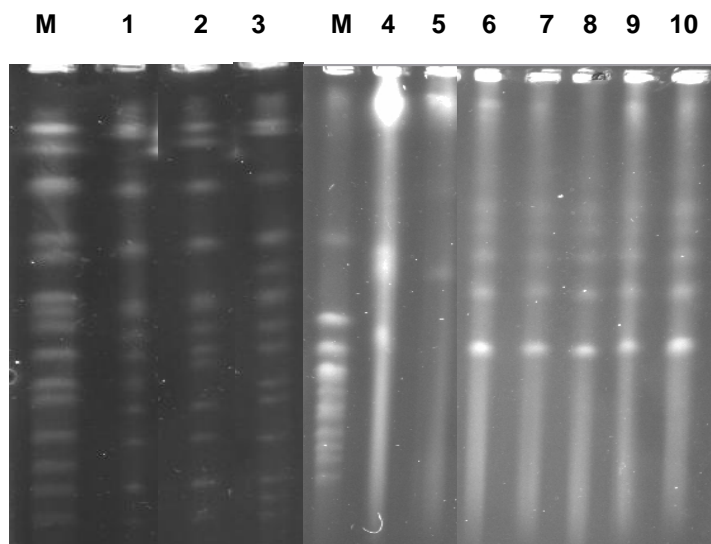


Figure 3 Karyotypes of the yeast founded at the end of the cultures mixed probed.



M: molecular weight of *S. cerevisiae* YPH80; 1-3, *S. cerevisiae* strains isolated at the end of the fermentation; 4, *K. marxianus* control; 5, *P. membranefaciens* control; 6, *Torulaspora delbrueckii* control; 7-10, strains isolated at the end of the fermentation from the culture no-*Saccharomyces*.

Table 1 Kinetics parameters of growth and fermentation of mixed cultures of strains *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces*.

Parameter	<i>S. cerevisiae</i> culture	no- <i>Saccharomyces</i> culture	Statistical difference
μ (per h)	0.29 \pm 0.09	0.24 \pm 0.06	0.6418
r_s (g/L/h)	3.84 \pm 0.12	1.03 \pm 0.22	0.0008*
r_p (g/L/h)	1.76 \pm 0.17	0.48 \pm 0.03	0.0000*
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.07 \pm 0.02	0.24 \pm 0.03	0.0733
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.45 \pm 0.06	0.47 \pm 0.03	0.8584
Biomass (g/L)	8.27 \pm 0.24	3.86 \pm 1.14	0.0331*
Total Alcohol (g/L)	25.5 \pm 1.19	15.56 \pm 1.68	0.0179*
Fermentation time (h)	18	>24	

*P < 0.05, μ : specific rate of growth; r_s , substrate consumed rate; r_p , ethanol production rate; $Y_{x/s}$, yield of biomass produced by mass substrate consumed; $Y_{p/s}$, yield of ethanol produced by substrate consumed.