

Evaluación del proceso artesanal de fermentación del mosto del *Agave Cocui* a través de la determinación de parámetros fisicoquímicos

Marluy Chirino, Héctor Morán, Wilmer Barrera y Iván Leal

Lab. Análisis Químico. CICBA. Departamento de Química. Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda". Coro Edo. Falcón. E-mail: ileal@unefm.edu.ve

Resumen

El *Agave cocui* es una planta que se desarrolla en las regiones semiáridas al sur del Estado Falcón, la cual ha sido explotada ampliamente para la obtención del licor de cocuy. Sin embargo este licor se produce artesanalmente y sin control de calidad. Actualmente existe un interés en el estudio del proceso de producción del cocuy con el fin de legalizar su producción y distribución. El proceso de fermentación artesanal del mosto del *Agave cocui* no ha sido estudiado. En este trabajo fueron evaluados dos procesos de fermentación artesanal a través de la determinación de parámetros físico químicos. Los parámetros evaluados en ambos procesos de fermentación durante cuatro días fueron: pH, sólidos totales, ácidos volátiles, nitrógeno amoniacal, azúcares totales, compuestos volátiles y etanol. Los resultados mostraron que el consumo de azúcares se encuentra entre los 85,9% y 87,2% a pesar de no estar controladas las temperaturas durante los procesos evaluados. Los contenidos de etanol producidos fueron de 7,85% y 5,59% con un rendimiento de 86,3% y 67,2% para ambos procesos estudiados.

Palabras clave: Fermentación, *Agave cocui*, parámetros fisicoquímicos.

Evaluation of the Traditional Fermentation Process of the *Agave cocui* Must Through the Determination of Physicochemical Parameters

Abstract

Agave cocui is a plant that grows in semi arid zones in the south of Falcon State, Venezuela. This plant is being exploited to the production of cocuy liquor. However, this beverage is produced traditionally without quality control. Actually, there is an interest in the investigation of the production process of the cocuy, with the intention to authorize its production and consumption. The fermentation process of agave juices has been not studied and this process is carried out by a traditional method. In this work two natural fermentation processes were evaluated through the determination of several physicochemical parameters. The parameters evaluated in the must of agave during four days were: temperature, pH, density, total solids, dissolved solids, volatile acids, amoniacal nitrogen, totals sugars were volatile compounds, and ethanol. The results showed that the consumption of sugars were between 85.9% and 87.2% even though the temperature of the studied process had not been controlled. The ethanol contents produced were 7.85% and 5.59% with a yields of 86.3% and 67.2%.

Key words: *Agave cocui* must, fermentation process, physicochemical parameters.

Introducción

El *Agave cocui* Trelease es una planta autóctona de Venezuela, típicas de las regiones desérticas. Tradicionalmente esta planta ha sido explotada para la elaboración de diversos productos artesanales [12] uno de los cual es el denominado licor cocuy. Este licor se obtiene a partir de la destilación del mosto o jugo elaborado a partir del tallo central o cabeza del *Agave cocui*. La elaboración del cocuy se realiza en forma artesanal mediante la extracción de la parte central o cabeza de la planta, sometida luego a un proceso de horneado que tiene como función hidrolizar los carbohidratos para transformarlos en azúcares fermentables, obteniéndose extractos de piñas color café de aroma dulce. En el proceso de molienda, las piñas ya cocidas son trituradas y maceradas en pilones o cubas de madera ubicadas al ras del piso, posteriormente se someten a un proceso de lavado, prensado y filtrado para obtener el mosto [12]. El mosto es el jugo obtenido de la planta por medio del estrujado, escurrido o prensado, siempre y cuando no se haya iniciado el proceso de fermentación. El

mosto obtenido es para la elaboración del cocuy tipo I (100% *Agave*), ya que para la elaboración del cocuy tipo II, se agrega sacarosa al mosto sin fermentar.

En la fermentación del mosto los azúcares simples como la glucosa y la fructosa, presentes en la planta [10,22], se transforman por acción metabólica de levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* [23] en alcohol etílico y otros componentes volátiles [6, 14] que contribuyen al sabor y olor característico del cocuy. Entre estos compuestos se encuentran los alcoholes superiores, los acetales y los ésteres [6, 15].

El producto resultante del proceso de fermentación es el mosto fermentado, un vino de unos cinco grados de alcohol que se destila en un alambique artesanal. El mosto forma parte esencial para la obtención de una bebida de alta calidad con un grado de alcohol adecuado. El proceso de fermentación depende de una serie de parámetros fisicoquímicos los cuales pueden controlarse para influir positivamente sobre la calidad de la bebida y sobre el rendimiento del proceso [2,24]. Entre estos parámetros se incluyen la temperatura, el

pH, el contenido de azúcar y de nitrógeno [6]. Por tanto, el principal objetivo de esta investigación es la evaluación del proceso de fermentación del mosto del *Agave cocui*, mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras

Las muestras de mostos fueron recolectadas por duplicado en la población de Pecaya, municipio Sucre del Estado Falcón, Venezuela, directamente en la planta artesanal de tres productores del licor de cocuy. Estas muestras fueron tomadas en intervalos de 2, 4, y 6 horas, durante el proceso de fermentación en envases de plástico; refrigeradas a 4°C e inmediatamente transportadas al laboratorio. Los parámetros determinados fueron pH, temperatura, ácidos volátiles, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, sólidos totales, sólidos disueltos, azúcares, contenido de etanol y compuestos volátiles.

Se analizaron dos cargas de mostos: 23 muestras para la primera carga de mosto fermentado, y 25 muestras para la segunda carga de mosto fermentado, ambos obtenidos de mostos de *Agave cocui* tipo I.

Métodos analíticos

Las determinaciones de pH se realizaron utilizando el potenciómetro y la temperatura utilizando termocuplas. Los ácidos volátiles (AV) se determinaron siguiendo el procedimiento 2310B de la Association of Analytical Chemist (AOAC) [1]. El Nitrógeno orgánico total y el nitrógeno amoniacal se determinaron por el método Kjeldah. Los sólidos totales se determinaron mediante el método 2540B de la A.O.A.C. y los sólidos totales disueltos mediante el método 2540C de la A.O.A.C. Los Azúcares Totales se determinaron mediante el método espectrocolorimétrico de Dubois y colaboradores [11]. Los compuestos volátiles se determinaron mediante cromatografía de gases con un Cromatógrafo CHROMPACK CP 9001, con una columna capilar CP-SIL 57 CB, con un detector FID. El gas de arrastre fue helio a una velocidad de flujo 12 mL/min, la temperatura del inyector fue 210°C, y la temperatura del detector 180°C. El programa de temperatura del horno para los volátiles mayoritario exceptuando el etanol fue el siguiente: temperatura inicial 38°C, la cual se mantuvo durante cinco minutos; calentamiento a 8°C/min hasta 106°C, permaneciendo a esta temperatura durante 1 min. Para el etanol se utilizó el siguiente programa de calentamiento: temperatura inicial 60°C, manteniéndose

durante 0,5 min; calentamiento a 10°C/min desde 60°C hasta 100°C, y finalmente a temperatura constante de 100°C durante 1 min. Los compuestos volátiles analizados fueron: además del etanol, el acetaldehído, acetato de etilo, metanol, isopropanol, alcohol isobutílico y alcohol isoamílico. Para la determinación cuantitativa del conjunto de compuestos volátiles se graficaron rectas de calibrado a partir de soluciones patrones a distintas concentraciones. El Volumen de Inyección fue de 1,0 μ L.

Resultados y Discusión

Evaluación de parámetros físicos-químicos

Temperatura

Durante la primera fermentación la temperatura ambiente se mantuvo entre 23,3 y 32,3°C, con un valor promedio de 27,9°C y la temperatura del mosto entre 27,1 y 33,1°C; mientras que para la segunda fermentación el intervalo de temperatura ambiente fue entre 23,5 y 31,1°C con un valor promedio de 27,6°C y la temperatura del mosto entre los 23,3 y 31,1°C (Tabla 1). En los valores obtenidos existen diferencias de temperatura entre ambas fermentaciones, debido a que el proceso de fermentación estudiado se realizó espontáneamente a temperatura ambiente (esto es a temperatura no controlada). Probablemente debido a las variaciones de las temperaturas durante el proceso de fermentación los tiempos de culminación del proceso de fermentación del mosto del cocuy fueron distintos para los dos procesos estudiados, encontrándose que para la primera fermentación el tiempo de fermentación fue de 93 horas y para la segunda fermentación de 107 horas. En la elaboración del tequila, bebida semejante al cocuy, se ha encontrado que las fermentaciones controladas a 35°C presentan un aumento en la eficiencia fermentativa, en la velocidad de producción de etanol y en la velocidad de consumo de azúcar [3].

pH

Durante el primer muestreo (primera fermentación); el tiempo inicial (0 horas) presenta un pH ácido de 3,92 y para el tiempo final (93 horas) un pH ácido de 4,50. Durante el segundo muestreo (segunda fermentación), se observó un pH ácido de 4,76 para el tiempo inicial (0 horas) y para el tiempo final (107 horas) un pH ácido de 4,89 (Tabla 1). Generalmente las levaduras responsables del proceso de fermentación metabolizan los azúcares en un medio neutro poco ácido. A pH por debajo de 3, la actividad de

Tabla I. Parámetros medidos en el mosto del Agave cocui durante el proceso de fermentación.

Parámetro	Primera fermentación 93 horas		Segunda fermentación 107 horas	
	Tiempo inicial (0)	Tiempo final (93)	Tiempo inicial (0)	Tiempo final (107)
Temperatura Ambiente (°C)	23,3	32,3	23,5	31,1
Temperatura del mosto (°C)	27,1	33,1	23,3	31,1
pH	3,92	4,50	4,76	4,89
Sólidos Totales (%)	13,06	4,40	11,9	5,58
Sólidos Disueltos (%)	10,9	4,96	13,5	4,82

las levaduras disminuye ocasionando la aparición de sulfuros libres en el medio fermentativo [5,7]. El proceso de fermentación evaluado se encontró dentro del intervalo de pH óptimo para el crecimiento de las levaduras que se encuentran entre pH 4,0 y pH 6,0 [22]. En la fermentación de mostos de *Agave tequilana* Weber el pH inicial del mosto es de 4,5 y en el transcurso de la fermentación tiende a bajar hasta alcanzar un valor alrededor de 3,9 [6].

Sólidos Totales

El porcentaje de sólidos totales determinados en el primer muestreo fue 13,6% y 4,40% correspondiente al tiempo inicial y final del fermentado y de 11,9% y 5,58% para las muestras de mostos de la segunda fermentación evaluada, en las condiciones iniciales y finales del proceso. Los resultados de ambos estudios presentan una diferencia de 1,66% con respecto a los tiempos iniciales y de 1,18% para los tiempos finales (Tabla 1). La diferencia de sólidos totales que existe en los tiempos iniciales puede deberse al tratamiento previo de la materia prima, como lo son la etapa de maceración y molienda (prensado, lavado y filtrado); en donde no ha comenzado a efectuarse la fermentación, mientras que en tiempo final se debe al metabolismo que sufre el mosto durante el tiempo de fermentación.

Sólidos Disueltos

Durante la primera fermentación el contenido de sólidos disueltos fue inicialmente de 10,9% hasta disminuir a un 4,96% al final del proceso fermentativo; y para los mostos analizados durante la segunda fermentación evaluada se obtuvo un 13,5% inicialmente y un 4,82% en el tiempo final (Tabla 1). Se pudo observar que existe una disminución del contenido de sólidos disueltos durante el transcurso del proceso fermentativo ya que unas de las sustancias que forman parte de los sólidos disueltos son los azúcares los cuales se consumen durante el proceso.

Ácidos Volátiles

El ácido acético es el principal constituyente de la acidez volátil del tequila [20], del whisky [16] y del cocui [17] y normalmente se encuentra en todas las bebidas fermentadas. En el primer muestreo (primera fermentación), se obtuvo una concentración de 0,546 y de 0,204 g/L de ácido correspondientes a los tiempos inicial y final respectivamente; para el segundo muestreo se obtuvo un valor 0,642 g/L de ácido al comienzo de la fermentación llegando a disminuir a un 0,168 g/L de ácido, al final de la fermentación (Fig. 1). Desde el punto de vista de la calidad del mosto y efectividad del proceso de fermentación los resultados obtenidos, están dentro de los valores normales, ya que si el contenido de ácido acético se encuentra en cantidades elevadas provoca una sensación desagradable (agria) en la bebida [13].

Nitrógeno Amoniacal

El nitrógeno amoniacal es la fuente preferida de nitrógeno de *S. cerevisiae* ya que esta levadura es incapaz de hidrolizar las proteínas presentes en el jugo de agave. Los valores de concentración del nitrógeno amoniacal encontrados en los mostos a lo largo de los dos procesos de fermentación evaluados fueron de 4,76 mg/L y 2,52 mg/L y de 5,49 mg/L y 1,34 mg/L para los tiempos iniciales y finales del proceso respectivamente (Fig. 2). Se pudo apreciar la disminución de nitrógeno amoniacal para ambas fermentaciones, lo cual se debe a la asimilación de esta especie por parte de las levaduras para poder desarrollarse durante el proceso fermentativo. Las diferencias de concentración del nitrógeno amoniacal en ambos muestreos, son producto de diferencias en la composición de la materia prima. Sin embargo este contenido de nitrógeno es considerado bajo para que se realice una fermentación lo más eficiente posible. La adición de una fuente adicional de nitrógeno al medio como fosfato de amonio dibásico acorta

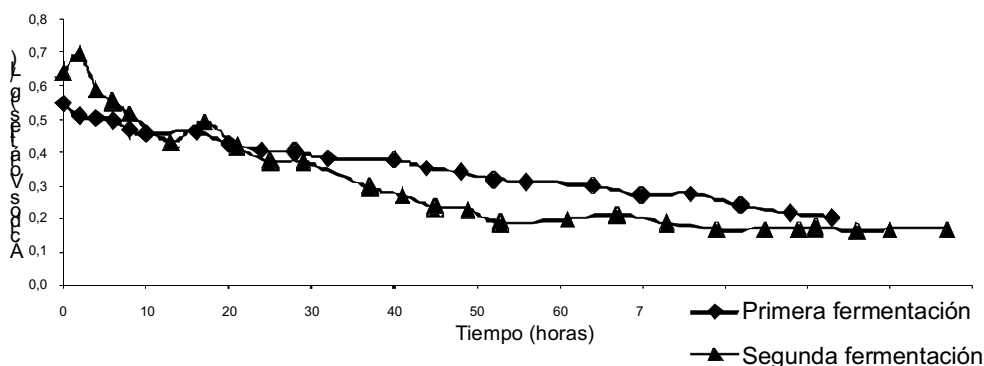


Figura 1. Comportamiento de los ácidos volátiles durante el proceso de fermentación.

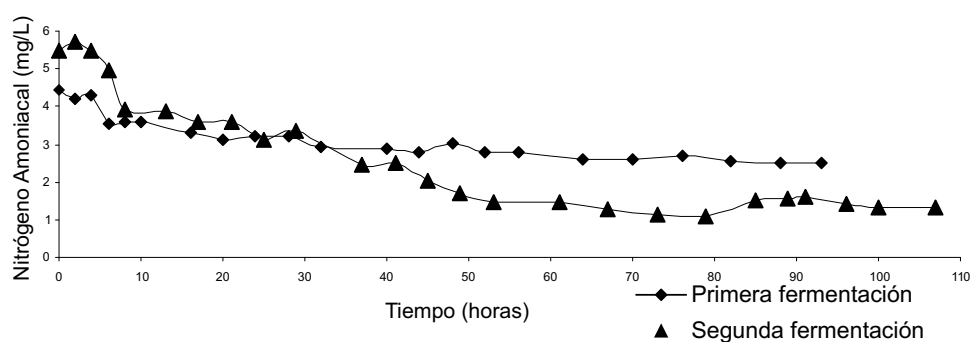


Figura 2. Comportamiento del nitrógeno amoniacal durante el proceso de fermentación.

el tiempo de fermentación del mosto y aumenta la producción de etanol hasta un 92% [23].

Evolución de los Azúcares

La fuente de carbono son los azúcares hidrolizables de la inulina presente en la planta de *Agave cocui*, principalmente la fructosa [8]. En el caso del tequila y del cocuy se pueden añadir otros azúcares fermentables como azúcar de caña y melazas de caña. En este caso se ha estudiado el proceso de fermentación del mosto de *Agave cocui* sin adición de azúcar. El porcentaje de azúcares durante el primer muestreo (primera fermentación) fue inicialmente de 17,8% disminuyendo esta en el transcurso del tiempo hasta llegar a un 2,58% de azúcar sin transformar. Para la segunda fermentación, el porcentaje inicial de azúcar fue de 16,1% disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un 2,27% de azúcar remanente (Fig. 3). El contenido inicial de azúcar, en ambos muestreos, difiere en un 1,67%. De acuerdo a la Fig. 3, pueden observarse dos regiones bien definidas, una primera zona entre el tiempo 0 y 50 horas en la que la pendiente del consumo de azúcar es más pronunciada. A partir de las 50 horas hasta aproximadamente las 80 horas hay un decaimiento más lento en el consumo de azúcar. Probablemente esto es debido a un cambio de sustrato de fructosa a glucosa azúcar presente en menor pro-

porción en el mosto [16]. Finalmente se observa una zona donde la concentración de azúcar permanece constante. La concentración de azúcar inicial debe ser controlada, ya que a una concentración muy elevada puede paralizar o impedir la fermentación por las condiciones osmófilas.

Evolución de Compuestos Volátiles

En las bebidas alcohólicas la mayoría de los compuestos responsables del olor y del sabor son volátiles. En el proceso de fermentación las levaduras son las responsables de la producción de estos compuestos organolépticos aunque estos se pueden producir en otras etapas de la producción del licor como lo es el cocimiento y molienda de la materia prima.

Los compuestos volátiles que se identificaron y se cuantificaron durante el proceso fermentativo de *Agave cocui* fueron además del etanol, el acetaldehído, acetato de etilo, metanol, isopropanol, alcohol isobutílico, alcohol isoamílico (Fig. 4).

El acetaldehído es el precursor inmediato del etanol; es obtenido por descarboxilación del ácido pirúvico mediante la enzima piruvato descarboxilasa en el proceso de fermentación. En el mosto del cocuy se observó una concentración inicial de 7,69 mg/L, con tendencia al ascenso durante aproximadamente las primeras 45 horas de fermentación.

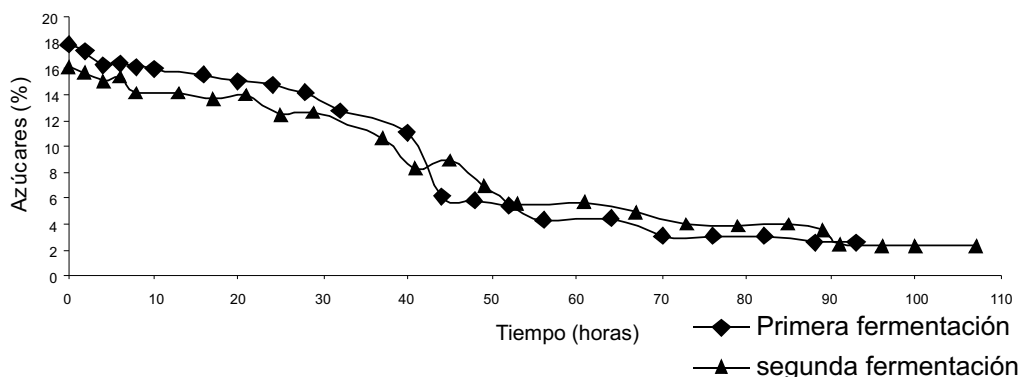


Figura 3. Comportamiento de los azúcares durante el proceso de fermentación.

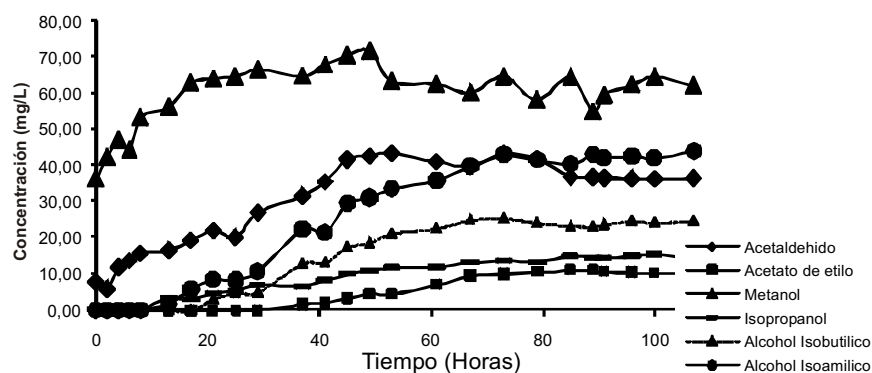


Figura 4. Variación de la concentración de los Compuestos Volátiles en el mosto del *Agave cocui* en el proceso de Fermentación.

tación donde se alcanza una concentración de 42 mg/L, luego se produce un pequeño descenso, producto de su transformación en etanol, hasta mantenerse aproximadamente constante hasta el final de la fermentación a una concentración de 36,4 mg/L.

El acetato de etilo en el mosto del cocuy aparece a partir de las 29 horas de fermentación con una concentración de 1,53 mg/L, aumentando progresivamente hasta llegar a una concentración máxima de 10,2 mg/L (Fig. 4). Este aumento se debe a que el acetato de etilo procede del metabolismo de las levaduras y de las bacterias acéticas en el proceso de fermentación. La síntesis de ésteres varía fuertemente entre las diferentes cepas de levaduras. Arellano (1999) [3] al trabajar con cepas aisladas del tequila detectó variaciones en la concentración de ésteres entre 9 y 48 mg/L.

El isopropanol se detectó a partir de las 13 horas después del inicio de la fermentación con una concentración de 3,15 mg/L, presentando una tendencia definida al ascenso hasta llegar a una concentración final constante después de las 80 horas de fermentación de aproximadamente 15 mg/L.

Al igual que alcohol isopropílico, los alcoholes isobutílico e isoamílico mostraron un comportamiento ascendente (Fig. 4). El alcohol isobutílico se detectó a las 17 horas de comenzar el proceso de fermentación con una concentración inicial de 3,06 mg/L, estabilizándose su concentración después de 80 horas de fermentación a una concentración de 24,6 mg/L. El alcohol isoamílico se detectó en un tiempo de 8 horas a partir de iniciado el proceso de fermentación a una concentración de 1,84 mg/L, a partir de este tiempo su concentración se incrementó hasta estabilizarse a una concentración final de 43,9 mg/L (Fig. 4). La presencia de estos alcoholes en el mosto proporciona buen sabor y olor a la bebida, manteniendo éstas en bajas concentraciones, ya que a partir de una concentración total de 300 mg/L, comienzan a ser totalmente desfavorables.

Para el metanol se encontró una tendencia algo distinta ya que se obtuvieron relativamente altas concentraciones desde el inicio de la fermentación (Fig. 4). La concentración inicial fue de 36,2 mg/L, produciéndose posteriormente un ascenso progresivo de la concentración hasta alcanzar un valor máximo de 71,5 mg/l a las 49 horas

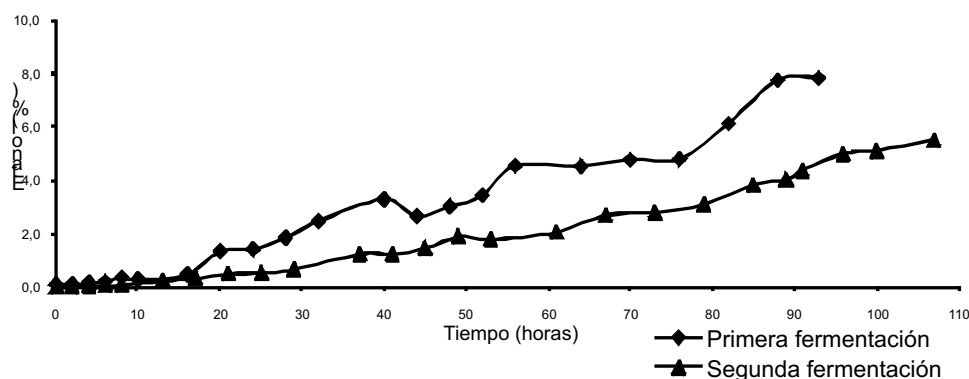


Figura 5. Perfil de composición del etanol durante el proceso de Fermentación.

de fermentación; posteriormente hay un descenso hasta permanecer prácticamente constante en torno a los 62 mg/L hasta el final de la fermentación. El metanol está en todas las bebidas fermentadas y proviene en gran parte de la desmetilación de pectinas la cual comienza a darse durante el cocimiento de las piñas, de allí su relativamente alta concentración en el tiempo cero de la fermentación [18]. Se sabe también que algunas cepas de levaduras, nativas en la fermentación del mosto de *Agave tequilana* Weber contienen metil estereasas, lo que podría explicar la generación del metanol durante la fermentación [21]. El metanol por ser tóxico debe estar presente a bajas concentraciones. En la bebida final (destilado) la máxima concentración permisible es de 25 mg/100 mL de alcohol anhidro según COVENIN 3340-97 [9], de tal forma que debe controlarse estrictamente el proceso de destilación para que la concentración final de metanol en la bebida sea menor a la permisible.

Contenido de Etanol

El porcentaje máximo de etanol en el primer muestreo fue de 7,85% y de 5,50% de etanol para el segundo muestreo; lo que representa una diferencia de 2,35% (Fig. 5). Esta diferencia puede deberse a las condiciones de la fermentación como por ejemplo, temperatura ambiente variable, pH, aireación y agitación las cuales se realizan de manera espontánea, sin un control preestablecido que ha finalizado la fermentación. En función de ello se determinó la productividad con el fin de evaluar la economía del proceso de fermentación. En el primer muestreo la productividad fue de 0,84 g/L*h para las 93 horas del proceso de fermentación; mientras que para el segundo muestreo la productividad fue solo de 0,51 g/L*h en un periodo de 107 horas. Estas diferencias son debido a la influencia de los parámetros básicos del proceso de fermentación en ambos muestreos.

El rendimiento de etanol, fue de 89,3% para el primer muestreo, siendo ésta mayor con respecto al segundo el cual fue de 67,8% expresado en g/L de etanol obtenido experimentalmente por g/L de etanol teórico. Se puede observar que a mayor cantidad de azúcar inicial se produce mayor rendimiento de etanol, sin embargo, hay que considerar que dentro del proceso de fermentación la cantidad de etanol producto de la actividad microbiana dependerá también de los parámetros básicos (pH, temperatura, sustancias nitrogenadas) presentes en el mosto y que actúan a lo largo del proceso de fermentación. Para el proceso de producción del tequila, se ha encontrado, que la eficiencia de la fermentación así como su productividad dependen del tiempo de cocción del agave encontrando valores de eficiencia entre 90 y 53% y de productividad entre 0,58 y 0,94 g/l.h para tiempos de cocción de 4 y 8,5 horas, respectivamente [19]. Por otra parte, la adición de nitrógeno en la fase exponencial de crecimiento de la levaduras puede incrementar la eficiencia de la fermentación hasta un 94% [4].

Conclusiones

El proceso de fermentación artesanal del mosto de Agave cocui se realiza a temperatura ambiente y a un pH no controlado, lo que produce variaciones tanto en el tiempo de duración del proceso, como en el contenido de etanol. Sin embargo el consumo de los azúcares encontrado fue muy similar, 87,2% para la primera fermentación y un 85,9% para la segunda fermentación. El rendimiento en etanol fue muy distinto para los dos procesos de fermentación estudiados, debido al poco control de los parámetros que influyen sobre el proceso.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Sr. Yoel Medina (productor de cocuy) y a su familia su gran disposición para colaborar con la realización de este trabajo, Marly Chirinos agradece al Decanato de Investigación de la UNEFM por el financiamiento otorgado a su trabajo de grado, Iván Leal Granadillo agradece al FONACIT por el financiamiento otorgado al Proyecto de Investigación codificado S1-2001001063.

Referencias

- [1] A.O.A.C. (1990). **Official Methods of Analysis**. 15th edición. Association of official Analytical Chemists. Arlington. Virginia.
- [2] AGU, R.; BRINGHURST, T.; BROSNAN, J.; JACK, F. (2008). Effect of Process Conditions on Alcohol Yield of Wheat, Maize and others Cereals. **J. Inst. Brew.** 114:39-44.
- [3] ARELLANO, M. (1999). Determinación del Perfil de Compuestos Organolépticos de Cuatro Cepas Aisladas de Jugo de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de Maestría en Ciencias en Procesos Biotecnológicos de la Universidad de Guadalajara.
- [4] ARRIZON, J.; GSCHAEDLER, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentration by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of tequila fermentation process. **Can. J. Microbiol.** 48:965-970.
- [5] BUONG H. LEE. (2000). **Fundamentos de Biotecnología de los alimentos**. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza – España. p.p. 68 –76.
- [6] CIATEJ (2004). **Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y Perspectivas**. Guadalajara. Pp. 63-120.
- [7] COLLADO Q. (2001). Levaduras y la Fermentación alcohólica (I), (II) y (III). Publicaciones Verema.com. Valencia – España.
- [8] CHIRINOS W.; MORÁN; H.; JAIMES, L.; LEAL, I. (2005). Determinación de azúcares presentes en mosto de *Agave cocui* mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). VII Congreso Venezolano de Química. Mérida. Venezuela.
- [9] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES, COVENIN. (1997). Bebidas alcohólicas. Norma 33-40.
- [10] DANKOVITSEV, A.; VOSTRIKOV, S.; MARKINA N. (2002). Fermentation studies on the traditional russian drink “Sourish Shchi”. **J. Inst. Brew.** 108:474-477.
- [11] DUBOIS M., GILLES A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 350-356.
- [12] GONZÁLEZ, C. (2001). Noticia Histórica sobre el Cocuy (*Agave cocui*) en Falcón. **Croizatia** 2 (3): p.173 – 186.
- [13] GRUEGER W., GRUEGER A. (1993). **Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial**. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza –España. p.73 –121.
- [14] LEAL, I.; CHIRINOS, E.; LEAL, M.; MORAN, H.; BARRERA, W. (2003). Caracterización fisicoquímica de la vinaza del *Agave cocui* y su posible uso agro industrial. **Multiciencias** 3 (2) 83-88.
- [15] LEAL, I.; MIQUILENA, R.; MORÁN, H. (2007). Evaluación del proceso de destilación artesanal del cocuy de pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. **Multiciencias.** 7(2) 181-187.
- [16] LYONS, I. (1995). **The production of Scotch and Irish Whiskies. En: The Alcohol Textbook**. Nottingham University Press, USA. 127-156.
- [17] MADRID, M.; RANGEL, M.; MARTINEZ, C.; MORÁN; H.; LEAL, I. (2007). Implementación de una columna empacada para la disminución de furfural en el proceso de destilación de Cocuy Pecadero. Memorias de Resúmenes de las VII Jornadas de Investigación de la UNEFM. Coro. Venezuela.
- [18] NYKANEN, L. (1998). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and alcoholic beverages. **Am. J. Enol. Vitic.** 37: 84 – 96.
- [19] PINAL, L. (2001). Influencia del tiempo de cocimiento sobre la generación de compuestos organolépticos en las etapas de cocimiento y de fermentación de la elaboración del tequila. Tesis de Maestría en Ciencias en procesos biotecnológicos de la Universidad de Guadalajara. Mexico.
- [20] PRADO, R. (2002). Destilación de Tequila y Mezcal. Factores que afectan la calidad del producto. Tesis de Doctorado. Universidad de Guadalajara. Guadalajara.
- [21] TÉLLEZ, P. (2001). Análisis de las variables que influyen en la síntesis de metanol en la producción de tequila durante las etapas de cocimiento y fermentación. Tesis de Maestría en Ciencias en Procesos Biotecnológicos de la Universidad de Guadalajara.
- [22] USSEGLIO-TOMASSET L. (1998). **Química Enológica**. Ediciones Mundi– Prensa. España. 127p.
- [23] YEGRES, F.; FERNÁNDEZ, Z.; PADIN, C.; ROVERO L. YEGRES N. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* en la fabricación del Licor de Cocuy. **Soc. Ven. Microbiología.** 23: 51-54.
- [24] YUE, Y.; ZHANG, W.; YAN. R. (2007). Design and Operation of an Artificial Pit for the Fermentation of Chinese Liqueur. **J. Int. Brew.** 113: 374-380.