



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**INFLUENCIA DE GLICINA O SULFATO DE AMONIO EN LA
FERMENTACIÓN DE *Agave potatorum* Zucc (TOBALÁ)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

ERIC GILBERTO ORTIZ BRAVO

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAÚL SALAS CORONADO

CO-DIRECTOR DE TESIS

M.C. ENRIQUE LEMUS FUENTES

HUAJUAPAN DE LEÓN OAXACA, MARZO DE 2006

RESUMEN

La elaboración del mezcal es un proceso sobre el cual influyen diversos factores, obteniéndose productos de calidad variable. En este trabajo se estudió el proceso de transformación de azúcares a alcohol en mosto de agave tobalá, bajo condiciones controladas de temperatura, mezclado y concentración de azúcares; empleando la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración inicial de 5.0 g/L. Además, se determinó el efecto de la adición de nitrógeno utilizando por separado sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y un aminoácido (glicina), efectuándose la comparación con un experimento control, preparado en ausencia de fuentes de nitrógeno externas. Las variables elegidas para medir el efecto de estos compuestos fueron el contenido de azúcares, etanol (EtOH) y biomasa.

Al término de la fermentación, el mosto adicionado con (NH₄)₂SO₄ mostró un consumo del 80.0% de azúcares, un crecimiento del 100.0% de biomasa y una concentración de EtOH de 27.5 g/L; en tanto que en el mosto con glicina existió un consumo del 65.0% de azúcares, un crecimiento de biomasa del 56.0% y una concentración de EtOH de 16.9 g/L. Por su parte, el mosto control presentó un consumo del 70.7% de azúcares, un crecimiento de biomasa del 61.6% y una concentración de EtOH de 17.5 g/L.

Con esto se concluyó que el uso de (NH₄)₂SO₄ ofrece mejores resultados en la fermentación de mosto de agave tobalá, incrementado el consumo de sustrato, el crecimiento de biomasa y la generación de producto.

**A mis padres Amelia e Isidro, a mis hermanas Ariadna y
Mitzi, a mis familiares y amigos**

AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Araceli M. Vera Guzmán, al Ing. Saúl Martínez Ramírez, y al Lic. Martín C. Ramales Osorio, por el material bibliográfico proporcionado.

Al Ing. Víctor M. Chagoya Méndez por permitirme conocer el proceso de elaboración del mezcal.

Al M.C. Vania S. Robles González; a las Ing. Brenda I. G. Licona Morán, Itzel N. García Luna e Irma González Cruz, a la Q.F.B. Griselda Bravo Villa así como al Tec. Pec. Eugenio Hernández Morales, por el apoyo y facilidades prestadas para el desarrollo del proyecto.

Al Lic. Ricardo García Jiménez, por las observaciones y correcciones realizadas.

A mi familia, amigos, maestros y a todas aquellas personas cuyo apoyo y paciencia brindados resultaron indispensables para la culminación de esta tesis.

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Índice de figuras.....	viii
Índice de gráficas.....	ix
Índice de tablas.....	x
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Definición de mezcal.....	1
1.2. Clasificación del mezcal.....	2
1.2.1. Según el sustrato utilizado en la fermentación.....	2
1.2.2. Según sus características sensoriales.....	2
1.3. Importancia económica del mezcal.....	3
1.4. Importancia social.....	5
1.5. La región productora de mezcal.....	5
1.6. Normas y control de calidad.....	5
1.7. Características del agave tobalá.....	7
1.8. El proceso de elaboración de mezcal.....	10
1.9. La fermentación alcohólica.....	14
1.9.1. Definición.....	14
1.9.2. El microorganismo.....	15
1.9.3. El sustrato.....	16
1.9.4. Los nutrimentos.....	16
1.9.5. La temperatura.....	18

1.9.6. El contenido de oxígeno disuelto.....	18
1.9.7. La concentración de iones hidrogeno (pH).....	19
1.10. Técnicas para el análisis de la fermentación.....	19
1.10.1. Cuantificación de microorganismos.....	19
1.10.2. Determinación de la cantidad de EtOH.....	20
1.10.3. Determinación de la cantidad de azúcares.....	21
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS.....	23
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo general.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1. Diagrama de bloques.....	27
5.2. Materiales y métodos.....	28
5.2.1. Colección y tratamiento de las plantas de agave.....	28
5.2.2. Obtención del mosto.....	28
5.2.3. Características del reactor.....	29
5.2.4. Establecimiento de los parámetros de fermentación.....	29
5.2.5. Preparación del mosto previo a la inoculación.....	30
5.2.6. Inoculación del mosto.....	30
5.2.7. Determinación de azúcares por colorimetría	31
5.2.8. Determinación de azúcares por cromatografía de líquidos (HPLC).....	31
5.2.9. Determinación de biomasa por sólidos volátiles.....	31
5.2.10. Determinación de EtOH por cromatografía de gases (CG).....	32

5.2.11. Análisis estadístico.....	32
6. RESULTADOS.....	33
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41
8. CONCLUSIONES.....	43
9. PERSPECTIVAS.....	44
10. PUBLICACIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46
ANEXO.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Vista superior del agave papalomé.....	7
2. Escapo floral (quiote) de agave.....	8
3. Recolección de cabezas de agave.....	10
4. Piñas de agave cocido en horno tradicional.....	11
5. Molienda de las piñas.....	12
6. Fermentación del mosto.....	12
7. Destilación y obtención del mezcal.....	13
8. Resumen de la fermentación alcohólica.....	14
9. Estructura del complejo generado a partir de la reacción de fructosa con fenol en medio ácido.....	21
10. Diagrama de flujo para la realización de las pruebas de fermentación.....	27
11. Reactor para la fermentación de mosto.....	29
12. Equipo de espectrofotometría UV/Visible.....	52
13. Cromatógrafo de líquidos.....	53
14. Cromatógrafo de gases.....	54

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
1. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 30 g azúcar/L.....	33
2. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	35
3. Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Q_s) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	36
4. Crecimiento de biomasa en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	37
5. Velocidad volumétrica de crecimiento de biomasa (Q_x) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	38
6. Generación de EtOH en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	39
7. Velocidad volumétrica de generación de producto (Q_p) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	40
8. Curva estándar para la determinación de azúcares por colorimetría.....	51
9. Curva estándar para la determinación de azúcares por HPLC.....	52
10. Curva estándar para determinación de EtOH por GC.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Consumo nacional aparente (CNA) y exportaciones.....	3
2. Destino de las exportaciones de mezcal.....	4
3. Exportaciones en volumen y en valor monetario.....	4
4. Especificaciones para la elaboración de mezcal.....	6
5. Especificaciones para la elaboración de bebidas alcohólicas..	6
6. Experimentos realizados y condiciones de fermentación.....	30
7. Consumo de azúcares en fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 30 g azúcar/L.....	33
8. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	36
9. Crecimiento de biomasa en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	38
10. Generación de EtOH en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L.....	40

1. ANTECEDENTES

1.1. Definición de mezcal

La NOM-070-SCFI-1994 define al mezcal como: “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados, directa y originalmente, con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de las siguientes especies de agave:

- *Agave potatorum* Zucc.
- *Agave angustifolia* Haw.
- *Agave esperrima* Jacobi.
- *Agave weberi* Cela.
- *Agave salmiana* Otto.
- Otras especies, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras denominaciones de origen dentro del estado.

Cada una de las cuales se someten a una hidrólisis o cocción, y posteriormente a una fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de efectuarse un enriquecimiento hasta con 20% de otros carbohidratos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le confieren las características a este producto.

El mezcal es un líquido de olor y sabor característico de acuerdo a su clasificación. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble o encino”.

1.2. Clasificación del mezcal

El mezcal puede clasificarse de diferentes formas de acuerdo con los siguientes criterios:

1.2.1. Según el sustrato utilizado en la fermentación. Como lo cita la NOM-070-SCFI-1994, los mostos de agave pueden ser enriquecidos con otros carbohidratos dando origen a dos tipos de mezcal:

- **Mezcal tipo I (100% agave).** Es aquel que para su elaboración se utilizan únicamente los mostos obtenidos de la cocción de las cabezas de agave.
- **Mezcal tipo II.** Es aquel que para su elaboración se utilizan los mostos obtenidos del agave, con un enriquecimiento que puede comprender hasta un 20% de otros carbohidratos.

1.2.2. Según sus características sensoriales. Aquí se involucran tanto el tiempo de reposo, como la adición de ingredientes para contribuir al sabor y aroma de la bebida:

- **Mezcal blanco.** Aquel que no sufre cambios en su sabor, ya sea por almacenamiento o por la adición de algún componente.
- **Mezcal reposado.** Aquel que después de su obtención se deja reposar en barricas de roble blanco o encino por un periodo no menor de dos meses y no mayor a un año.
- **Mezcal añejo o añejado.** Aquel que después de su obtención se deja reposar en barricas de roble blanco o encino por un periodo mínimo de un año.
- **Mezcal abocado.** Aquel cuyo sabor ha sido suavizado o modificado mediante la adición de uno o más productos

naturales, saborizantes o colorantes, siempre y cuando estén permitidos por la Secretaría de Salud.

1.3. Importancia económica del mezcal

Para comprender la importancia económica del mezcal, es indispensable analizar algunos datos relacionados con la cantidad de la bebida producida y la suma de ingresos generados tanto a nivel nacional como internacional, involucrando de manera implícita el volumen de exportaciones. Rames-Osorio y Barragán-Ramírez (2002), muestran que en el año 2000, el volumen de mezcal producido a nivel nacional fue superior respecto al generado en el año 1994 (Tabla 1). Así mismo, al efectuarse un análisis del Consumo Nacional Aparente (CNA) y del volumen de exportaciones realizadas, se tiene que un porcentaje alto de la producción nacional se exportó hacia países de América, Europa y Asia (Tabla 2).

Tabla 1. Consumo nacional aparente(CNA*) y exportaciones

Año	Producción nacional (L)	CNA (L)	CNA (% de la producción total)	Exportaciones (L)	Exportaciones (% de la producción total)
1994	2, 875, 000	2, 238 ,000	78.0	637, 000	22.0
1995	4, 109, 820	2, 997, 594	72.9	1, 112, 226	27.1
1996	5, 875, 000	4, 015, 000	68.0	1, 860, 000	32.0
1997	7, 220, 000	3, 940, 000	57.6	3, 280, 000	45.4
1998	8, 500, 000	4, 500, 000	53.0	4, 000, 000	47.0
1999	9, 000, 000	4, 300, 000	47.7	4, 700, 000	52.2
2000	8, 400, 000	3, 700, 000	44.0	4, 700, 000	56.0

*CNA = producción nacional + importaciones – exportaciones

Fuente: Rames-Osorio M. y Barragán-Ramírez M. (2002)

Tabla 2. Destino de las exportaciones de mezcal

América	Europa	Asia
Argentina	Alemania	Hong Kong
Bolivia	España	Japón
Canadá	Francia	Taiwán
Colombia	Grecia	Turquía
Chile	Italia	
Ecuador	Países Bajos	
El Salvador	Portugal	
EUA	Reino Unido	

Fuente: Ramales-Osorio M. y Barragán-Ramírez M. (2002)

Las exportaciones, traducidas a valores monetarios (Tabla 3), indican una fuerte contribución a la economía estatal y nacional, pasando de 1,274,000 dls en 1994 a 79,900,000 dls en 2000.

Tabla 3. Exportaciones en volumen y en valor monetario

Año	Exportaciones (L)	Exportaciones (dólares)
1994	637, 000	1, 274, 000
1995	1, 112, 226	1, 392, 256
1996	1, 860, 000	5, 580, 000
1997	3, 280, 000	11, 480, 000
1998	4, 000, 000	16, 000, 000
1999	4, 700, 000	23, 500, 000
2000	4, 700, 000	79, 900, 000

Fuente: Ramales-Osorio M. y Barragán-Ramírez M. (2002)

De la misma forma, puede observarse que a partir de 1998 existió un comportamiento relativamente uniforme por parte del CNA y de las importaciones, lo cual no impidió un aumento en los ingresos aportados por estas últimas.

1.4. Importancia social

Ramales-Osorio y Barragán-Ramírez (2002), señalan que, debido a los niveles altos de pobreza que presenta el estado de Oaxaca, la industria del mezcal tiene una gran trascendencia a nivel social, favoreciendo la generación de empleos y divisas por las exportaciones del producto y evitando así fenómenos como la emigración. Así mismo, los autores citados consideran a la industria mezcalera como una de las pocas manufactureras existentes en el estado de Oaxaca, de suma importancia para su desarrollo económico y social, dada la escasa participación del sector secundario en la producción de bienes y servicios (18.9% de la producción total).

1.5. La región productora de mezcal

Según la denominación de origen, publicada en el Diario Oficial de la Federación en el mes de noviembre de 1994; la siembra, cultivo y extracción de agave para la elaboración del mezcal deben desarrollarse en los estados de Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. Particularmente, en el estado de Oaxaca, existe una zona dedicada principalmente a la producción de mezcal que comprende los municipios de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán.

1.6. Normas y control de calidad

La importancia económica y social del mezcal exige definir lineamientos que permitan regular su calidad, limitando la concentración de componentes que puedan ser nocivos para la salud, o bien, que puedan afectar sus características sensoriales. Por ello, a partir de 1994 se

estableció la NOM-070-SCFI, que especifica los aspectos a regularse en la obtención del mezcal (Tabla 4).

Tabla 4. Especificaciones para la elaboración de mezcal

Especificaciones	Mínimo	Máximo
% de alcohol en volumen a 20 °C (°G.L.)	36.0	55.0
Extracto seco (g/L)	0.2	10.0
Acidez total (mg/mL de alcohol anhidro)	N.E.*	170.0
Alcoholes superiores (mg/mL de alcohol anhidro)	100	400
Metanol (mg/mL de alcohol anhidro)	100	300

*No especificado

Así mismo, la NOM-142-SSA1-1995, referente a las especificaciones sanitarias de bebidas alcohólicas (Tabla 5), establece la regulación de las siguientes características:

Tabla 5. Especificaciones para la elaboración de bebidas alcohólicas

Especificaciones	Límite máximo (mg/mL de alcohol anhidro)
Metanol	300
Aldehídos	40
Furfural	4
Alcoholes superiores*	500

*Expresados en aceite de fusel o alcoholes de peso molecular superior al alcohol etílico expresado como alcohol amílico

Además, con la finalidad de vigilar la aplicación de estas normas, se fundó el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A. C. (COMERCAM), integrado por productores de mezcal de los estados de Oaxaca, Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Durango, quienes trabajan en coordinación con la Secretaría de Desarrollo Industrial y Comercial (SEDEINCO), así como con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).

1.7. Características del agave tobalá

El agave tobalá pertenece al tipo de plantas conocidas como plantas crasas, esto es, plantas caracterizadas por contar con un tallo engrosado cuya finalidad es la de ser una reserva de agua debido a las condiciones climáticas en las que crecen. Sus hojas se encuentran dispuestas a manera de espiral confiriéndole una forma de roseta (Figura 1).



Figura 1. Vista superior del agave tobalá

La planta se divide en una zona aérea y una subterránea. La zona aérea está integrada por el tallo (cabeza o piña), las hojas (pencas) y otro tallo (escapo floral) conocido como quiote, que es donde se localizan las flores al alcanzar la madurez (Figura 2); en tanto que la zona subterránea se conforma por el sistema de raíces.

Como reporta Martínez-Ramírez, el tamaño de la planta varía desde los 33 cm hasta 1 m, dependiendo de factores como el tipo de suelo y el clima.



Figura 2. Escapo floral (quiote) de agave

El mismo autor menciona que sus hojas se caracterizan por ser de color verde grisáceo, más anchas en la zona media y estrechándose en las zonas de la base y punta, finalizando esta última con una espina muy rígida, cuya tonalidad va desde el rojo óxido hasta el café rojizo. Las partes laterales de las hojas se encuentran cubiertas de espinas de una tonalidad rojo óxido y en forma de gancho. El ancho de la hoja puede variar desde los 9 a los 18 cm y su largo desde los 25 a 40 cm.

El comportamiento de las hojas es el siguiente: Se despliegan a partir de una estructura en forma de cono (cogollo) situada en la parte superior de

la planta (zona apical). Conforme las hojas se van desplegando, estas van ocupando la parte media de la planta para después morir de manera progresiva al ser desplazadas por hojas nuevas, tomando como destino final la zona inferior de la planta.

En la zona apical también se lleva a cabo el crecimiento del escapo floral o quiole, que es una estructura que solo crece al alcanzar su madurez reproductiva. Según el autor citado anteriormente, el diámetro y la altura del escapo pueden variar dependiendo de las condiciones donde crece la planta y especialmente por la fertilidad del suelo, variando desde los 4 hasta los 12 cm de diámetro y desde los 2 hasta los 5 m de altura (considerando la distancia desde la base del maguey hasta la punta del escapo).

El tiempo necesario para la maduración de la planta oscila entre los seis y nueve años y podría observarse de la siguiente manera: al llevarse a cabo la germinación y en las primeras etapas de desarrollo, la planta es pequeña y se integra únicamente por el sistema de raíces en la zona basal y las hojas en la zona apical. Al aproximarse a su estado de madurez el tallo comienza a engrosarse y, al encontrarse plenamente en el estado maduro, el cogollo comienza a tomar una forma cilíndrica, el cual es indicio de que el escapo está por aparecer. Al surgir este, su crecimiento es rápido, alcanzando su estado final en aproximadamente dos meses.

En la elaboración del mezcal, un agave en el óptimo estado de madurez resulta de especial importancia debido a que, en esta etapa, puede proporcionar cantidades altas de azúcar, lo que equivale a un rendimiento alto de alcohol.

A pesar de la amplia terminología que los trabajadores de las fábricas utilizan para reconocer al agave en sus diferentes estados de madurez, las condiciones que generalmente se toman en cuenta para la identificación y selección de este son:

- Ausencia de enfermedades o plagas.
- Grado de desarrollo del escapo floral.
- Coloración de las pencas.

Por otra parte, para evitar que se lleve a cabo la reproducción de la planta (y su muerte posterior), se corta el escapo floral, conservándose así la planta el tiempo necesario para recolectarla.

1.8 . El proceso de elaboración de mezcal

La fabricación de mezcal empieza con la recolección y recepción de las cabezas de agave (Figura 3), que en una primera etapa se fraccionan y se someten a un cocimiento en hornos de forma cónica inversa, recubiertos con piedras con el fin de mantener el calor (Figura 4).



Figura 3. Recolección de cabezas de agave



Figura 4. Piñas de agave cocido en horno tradicional

El cocimiento se realiza con calor directo (utilizando leña), existiendo pérdidas de azúcares, ya que en ocasiones una parte de la piña no se cuece y en otras, la piña que tiene contacto con las piedras se quema, generándose mieles amargas. Además, el sabor a humo que queda en el agave cocido puede conferirle un sabor desagradable al mezcal.

Posteriormente, el agave se coloca en una pila de piedra en donde una piedra lleva a cabo su trituración (también conocida como molienda), empleando la fuerza de un caballo (Figura 5). Cuando el encargado de la fábrica considera que el proceso ha terminado, se procede a transferir la materia prima triturada (150 kg) a las tinajas de fermentación (Figura 6).

Luego de colocar el agave triturado en las tinajas, se le adiciona agua a 40°C y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 kg por tina de 300 L), se deja reposar por un periodo de 24 h y se añade agua fría (extraída de pozos a una temperatura de 15°C), mezclándose manualmente durante 2 h. A continuación, se deja reposar durante tres días o hasta que termine el proceso de fermentación, evaluando de forma empírica el progreso de la operación mediante la intensidad del ruido que se genera en el fermentador, debido a la formación de CO_2 (Fábrica de mezcal “Chagoya”).



Figura 5. Molienda de las piñas



Figura 6. Fermentación del mosto

Finalmente, se realiza una destilación empleando alambiques de cobre (Figura 7) y aplicando calor directo (para esto, generalmente se utiliza leña). Los vapores de alcohol (mezcal) generados por el calentamiento del mosto fermentado, se enfrían al pasar por un condensador o serpentín, que se encuentra inmerso en un estanque de agua a temperatura ambiente.

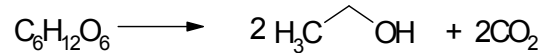
Es importante mencionar, que todo el proceso de elaboración de mezcal se basa en parámetros de calidad establecidos de manera empírica por cada fábrica. Esto hace que, además de la especie de agave y el tipo de microorganismos utilizado; el procedimiento de elaboración de mezcal sea un factor adicional que influye de forma notable sobre sus características sensoriales.



Figura 7. Destilación y obtención del mezcal

1.9. La fermentación alcohólica

1.9.1. Definición. El término “fermentación alcohólica” se refiere a la transformación bioquímica de la glucosa y fructosa a EtOH y dióxido de carbono (CO₂) de acuerdo a la ecuación de Gay-Lussac:



Este proceso inicia con la degradación de los azúcares a ácido pirúvico vía glicólisis utilizando la ruta de Embden-Meyerhof. De manera subsecuente, el ácido pirúvico es descarboxilado a acetaldehído seguido por su reducción a EtOH en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y NADH₂ (Figura 8) (Delfini y Formica, 2001).

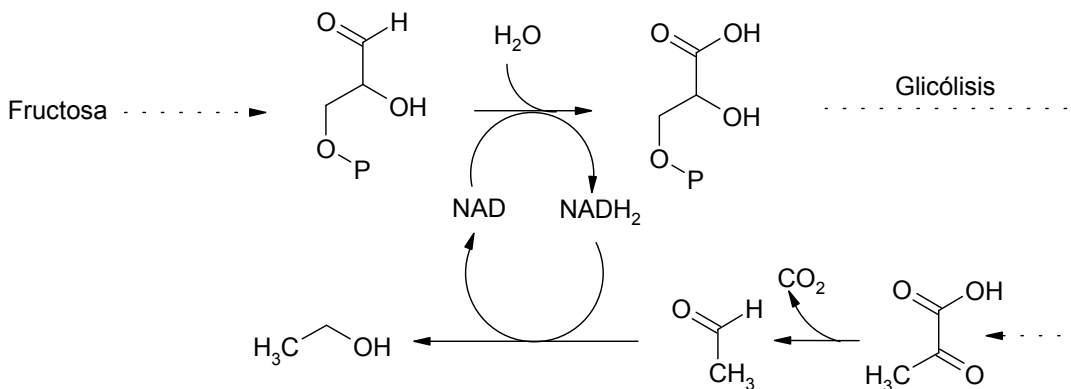


Figura 8. Resumen de la fermentación alcohólica

A partir del ácido pirúvico y el acetaldehído, las levaduras pueden formar ácido acético, láctico, málico, butírico, acetilmetilcarbinol y acetona. Otros subproductos generados son los aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, etil ésteres de ácidos grasos, alcoholes como el propanol, alcohol amílico e isoamílico, dióxido de azufre y en general, todos los compuestos volátiles producidos por las levaduras.

La precursora de muchos de estos productos secundarios es la acetil-CoA derivada del ácido pirúvico. La acetil-CoA puede dar origen a ácidos grasos de cadena media (caproico, caprílico, cáprico y láurico), ácidos grasos de cadena larga (mirístico, palmítico y esteárico), ácidos grasos insaturados de cadena larga (palmitoleico, oléico, linoléico y linolénico) y esteroides.

Cuando el mosto es deficiente en estos compuestos, se sintetizan a partir de la acetil-CoA en presencia de oxígeno. Por el contrario, si ya existen en el medio, la levadura puede asimilarlos directamente y transformarlos en otras moléculas como los polifenoles, que son útiles para la regulación de los procesos de óxido-reducción (Delfini y Formica, 2001).

1.9.2. El microorganismo. Las características deseadas de un proceso de producción industrial de EtOH depende en gran medida del microorganismo utilizado en la fermentación. Estos deben tener un rendimiento alto de formación de producto por unidad de sustrato asimilado, una tolerancia importante al EtOH, la capacidad de mantenerse viable a temperaturas altas y tolerancia a valores de pH bajos. Debido a estas características los microorganismos utilizados para la producción de EtOH son las levaduras del género *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (Greenfield, Pamment y Jones, 1981). De estas últimas, la especie *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza comúnmente debido a su alta tendencia hacia la fermentación alcohólica y por su capacidad de crecimiento bajo condiciones anaerobias estrictas (Pronk y col., 1996).

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de sustratos dependiendo de la especie en cuestión. En general, estos microorganismos son capaces de crecer y fermentar de manera eficiente a pH de 3.5 a 6.0 y temperaturas de 15 a 35 °C. Aunque a temperaturas elevadas (40 °C) la tasa inicial de producción de EtOH es

alto, el rendimiento total de la fermentación disminuye debido a una inhibición atribuida a concentraciones elevadas del EtOH producido y a la temperatura del reactor (Kosaric y col., 1983).

1.9.3. El sustrato. Según su importancia técnica, los sustratos pueden ser divididos en tres tipos: ricos en azúcares simples (melazas, jugo de caña, etc.); ricos en almidones (cereales, papa, etc.) y ricos en celulosa (madera, bagazos, etc.) (Esser y Schmidt, 1982 y Ostergaard, Olsson y Nielsen, 2000). Cuando se utilizan sustratos ricos en almidón o celulosa, se requiere efectuar una hidrólisis para fragmentar y transformar las cadenas de polisacáridos en azúcares simples (Greenfield, Pamment y Jones, 1981). Tal es el caso de los agaves, en donde existen azúcares denominados fructanos que necesitan fragmentarse mediante la hidrólisis (cocción) para dar origen a azúcares simples, siendo en su mayoría fructosa.

1.9.4. Los nutrimentos. Existen numerosos compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, que son utilizados por los microorganismos para desempeñar tareas muy importantes además de la obtención de energía como lo es la síntesis de aminoácidos y la regulación de reacciones de carácter metabólico. Los nutrimentos utilizados por las levaduras se detallan a continuación.

- **Nitrógeno.** El contenido de nitrógeno de las levaduras es de aproximadamente el 10% del peso seco y como tal representa un constituyente importante de cualquier medio de crecimiento. Por lo general, las levaduras son capaces de utilizar iones amonio como única fuente de nitrógeno. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es la fuente de nitrógeno más utilizada en fermentaciones de carácter industrial (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

Las fuentes de nitrógeno más complejas, como mezclas de aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, bases simples (colina, betaína, etc.), ácidos grasos y material lipídico presentan una capacidad potenciadora del crecimiento y fermentación de las levaduras. La contribución de los aminoácidos constituye la mayor parte de estos efectos con los aminoácidos transportados activamente por sistemas generales y específicos. El transporte de iones amonio y aminoácidos se inhiben mutuamente debido a su competencia por el ATP de la membrana.

Las mezclas de aminoácidos son fuentes de nitrógeno más eficientes que los iones amonio, debido a que los aminoácidos proveen de una cantidad adicional de carbono respecto a los iones amonio (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

La concentración de nitrógeno provisto por aminoácidos, así como la relación carbono nitrógeno, regulan la actividad de la ruta glicolítica. De forma adicional, los aminoácidos sirven como buffer contra efectos de inhibición iónica y regulan las reacciones de óxido-reducción (Mauricio y col., 2001).

Las purinas, pirimidinas y péptidos son fácilmente asimilados por la levadura e incrementan los rendimientos de biomasa. La contribución de estas fuentes adicionales de nitrógeno es compleja, sin embargo su omisión disminuye el rendimiento de la fermentación (Greenfield, Pamment y Jones, 1981 y Albers y col., 1996).

- **Azufre.** Además del azufre elemental, se puede utilizar el sulfato inorgánico. En este caso, el sulfato se reduce a metionina dentro de la célula. La metionina, sin embargo, es muy costosa como fuente de nitrógeno, por lo que se utiliza generalmente el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Otros compuestos importantes son el fósforo y las vitaminas, así como algunos elementos como el potasio, magnesio, cloro, entre otros (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

1.9.5. La temperatura. Las temperaturas óptimas de crecimiento y fermentación guardan una dependencia con el tipo de microorganismo. Particularmente, el género *Saccharomyces* presenta velocidades altas de crecimiento en un intervalo de temperatura de 28 a 35 °C. Sin embargo, para que se lleve a cabo un consumo completo del sustrato y una mayor producción de EtOH en fermentaciones por lotes, la temperatura óptima debe ser inferior a las anteriormente descritas, esto con la finalidad de regular la velocidad de generación de EtOH y evitar acumulaciones dentro de la célula, trayendo como consecuencia la inhibición en el crecimiento de las levaduras (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

1.9.6. El contenido de oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto en el medio se emplea principalmente como aceptor de electrones al final de la cadena respiratoria. De manera adicional, el oxígeno también actúa como factor de crecimiento al estar aparentemente relacionado con la síntesis de ácido oleico y ergosterol, estimulantes del crecimiento de las levaduras en condiciones anaerobias (Andreasen y Stier, 1954; véase Nagodawithana, Castellano y Steinkraus, 1981). Adicionalmente, estos autores demostraron la existencia de una relación entre la temperatura y la cantidad de oxígeno disuelto en la producción de EtOH, al fermentar soluciones de miel utilizando *S. cerevisiae*. Sus estudios, mostraron que a una concentración de oxígeno disuelto del 13% y una temperatura de 15 °C, la cantidad de EtOH y de microorganismos viables fue mayor que al emplear temperaturas y concentraciones de oxígeno mayores.

1.9.7. La concentración de iones hidrógeno (pH). *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo acidófilo, que presenta un intervalo de pH de crecimiento óptimo entre 4 y 6.

La importancia del pH en fermentaciones radica en que, durante su crecimiento, las levaduras necesitan mantener un pH constante en su interior, con la finalidad de que las enzimas que participan en su metabolismo y crecimiento funcionen de manera adecuada. Cuando existe una variación en el pH extracelular, las levaduras invierten energía buscando equilibrar su pH interno, incorporando o eliminando iones hidrógeno. Sin embargo, al existir variaciones altas, les resulta imposible mantener el pH intracelular, desactivándose sus enzimas e impidiendo el crecimiento celular y la producción de EtOH. (Greenfield, Pamment y Jones, 1981; Neelakantam, Narendranath y Power, 2005).

1.10. Técnicas para el análisis de la fermentación

La fermentación alcohólica puede analizarse efectuando la medición de variables como el contenido de biomasa, la concentración de azúcares reductores y la cantidad de EtOH generado.

1.10.1. Cuantificación de microorganismos. La cuantificación de microorganismos puede llevarse a cabo por diferentes técnicas como la cuenta directa al microscopio, la determinación del peso seco o el contenido de sólidos volátiles.

- **Determinación de sólidos volátiles.** Consiste en determinar el contenido de microorganismos en forma de biomasa, considerándose como materia orgánica calcinada a una temperatura de entre 500 y 600 °C. Este valor se obtiene a partir de la diferencia entre la materia inorgánica residuo de la calcinación y el peso total de la muestra antes de la calcinación. Esta muestra

debe prepararse, haciéndose pasar por un microfiltro de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 0.45 micrones, esto con la finalidad de eliminar sólidos solubles. Así mismo la muestra debe encontrarse libre de humedad. La ventaja principal de esta técnica es su confiabilidad, debido a que elimina la interferencia de sales u otra materia soluble (Metcalf-Eddy Inc., 1985).

1.10.2. Determinación de la cantidad de EtOH. Para la determinación del contenido de EtOH en una muestra, la mayoría de las técnicas empleadas requieren la destilación de la misma, con la finalidad de eliminar componentes que puedan interferir en el análisis. Sin embargo, la cromatografía de gases (GC), reduce la importancia de este aspecto, debido a que las condiciones de operación del equipo permiten la separación de los componentes de la mezcla, permitiendo identificar y cuantificar el EtOH sin la presencia de otros compuestos. Además, tiene la gran ventaja de requerir volúmenes de muestra muy pequeños (de 1 a 5 μL), lo que permite realizar análisis a pequeña escala.

Como descripción general, la muestra en estado gaseoso se desplaza con ayuda de un gas inerte (denominado fase móvil) a través de una columna en cuyo interior se halla un agente denominado fase estacionaria. Al pasar por la columna, existe una retención por parte de la fase estacionaria hacia los componentes de la muestra, variando en mayor o menor grado, dependiendo de la afinidad de cada uno de los componentes hacia la fase. Así, al crearse una distribución desigual de componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria, los componentes que sean más fuertemente retenidos por la fase estacionaria se desplazarán de manera más lenta a través de la columna que aquellos cuya retención sea menor. Como consecuencia de este fenómeno se efectúa la separación, representada por la formación de picos (conocidos como cromatogramas), los cuales pueden analizarse tanto de manera cualitativa como cuantitativa (Skoog, Holler y Nieman, 2001).

1.10.3. Determinación de la cantidad de azúcares. En la cuantificación de azúcares, específicamente azúcares reductores, se emplean técnicas que evalúan propiedades como el índice de refracción o la capacidad de reducción de reactivos como el sulfato de cobre (Pearson, 1986). Hay otras técnicas que emplean equipos de análisis instrumental como el caso del método colorimétrico (Dubois, 1956) y la cromatografía de líquidos, cuyas características se describen a continuación.

- **Método de Dubois.** Esta determinación consiste en hacer reaccionar el azúcar con fenol utilizando ácido sulfúrico para generar un compuesto colorido (Figura 9).

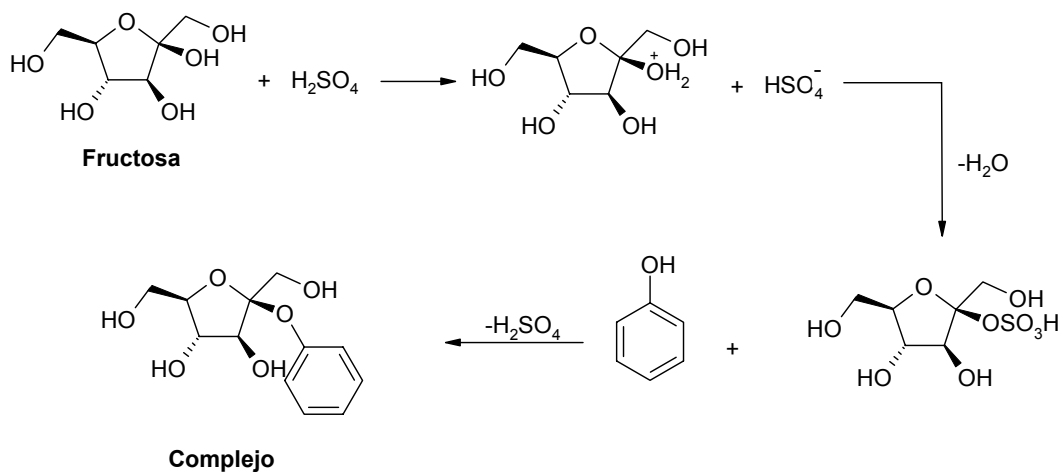


Figura 9. Estructura del complejo generado a partir de la reacción de fructosa con fenol en medio ácido

Existiendo una estrecha relación entre la intensidad de coloración y la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra. Está técnica determina concentraciones bajas de azúcar, teniendo como límite máximo las 60 ppm.

- **Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés).** La cromatografía de líquidos se considera de importancia especial debido su alta sensibilidad en los resultados, utilizando cantidades reducidas de muestra (10 a 50 μL) y al amplio número de compuestos susceptibles de ser analizados, siendo algunos de estos no volátiles o bien, termolábiles. Dentro de estos compuestos se encuentran los carbohidratos.

Su funcionamiento consiste en desplazar un volumen de muestra en estado líquido, con ayuda de una mezcla de disolventes (fase móvil), a través de una columna con una fase estacionaria adecuada según el tipo de compuesto que se pretende analizar. De forma semejante a la cromatografía de gases, la diferencia de afinidad hacia la fase estacionaria, permite la separación y posterior cuantificación de componentes de la muestra.

En general, estas técnicas tienen la ventaja de ser precisas, además de determinar concentraciones tan pequeñas de azúcar como las partes por millón (ppm), por lo que se necesita poca cantidad de muestra para realizar el análisis.

2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

De los estudios relacionados con fermentaciones en la elaboración del mezcal, destacan los realizados con los agaves tobalá y espadín (*Agave angustifolia Haw*), por Vera-Guzmán y col. (2002). Ellos demostraron que la fermentación del agave tobalá tuvo una mayor eficiencia de conversión de azúcares en EtOH (48% de rendimiento), que la fermentación del agave espadín (29% de rendimiento). Además, al efectuarse la comparación del contenido de alcoholes superiores (2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol) se encontró una concentración menor en el mosto de agave tobalá que en el agave espadín. Estos resultados se atribuyeron a las diferencias en las concentraciones de compuestos nitrogenados en el mosto de cada uno de los agaves, correspondiendo a valores iniciales de nitrógeno total de 403 mg/mL para el agave tobalá y 209 mg/mL para el agave espadín. Por otra parte, el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permite acelerar el proceso de fermentación y es una práctica común en los palenques. En otro estudio realizado por Terán-Sangermán y col. (2002), se demostró que la eficiencia en la formación de EtOH con respecto al contenido inicial de azúcares en mosto de agave espadín, utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fue del 32.2%, en tanto que para mostos del mismo agave sin este compuesto, la eficiencia fermentativa fue del 20.8%. Estos resultados se atribuyeron a una mayor cantidad de nitrógeno proporcionado por el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dentro de las particularidades de los estudios, está el hecho de que todos estos se realizaron en fábricas, midiendo las condiciones ambientales, sin establecer un control sobre las mismas.

Estudios efectuados por Albers y col. (1996), en fermentaciones de un medio sintético compuesto principalmente por glucosa, revelaron que en comparación con el uso de aminoácidos, el rendimiento en la cantidad de EtOH obtenido fue menor al utilizar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, atribuyéndose este comportamiento a una relación existente entre la producción de glicerol y la existencia de sales de amonio como única fuente de nitrógeno.

El efecto de la adición de glicina ha sido reportado por Manginot y col. (1997) y Manginot, Roustan y Sablayrolles (1998) en la fase estacionaria de crecimiento de biomasa, al fermentar un medio sintético compuesto por glucosa y fructosa como fuentes de carbono y con una mezcla de aminoácidos como fuentes de nitrógeno inicial. En el estudio se encontró que la glicina se asimiló de forma similar o mejor que la mayoría de los 30 aminoácidos utilizados, e incluso que el NH_4Cl utilizado como fuente inorgánica de nitrógeno en el experimento.

3. HIPÓTESIS

El empleo de glicina como fuente de nitrógeno aumenta el consumo de azúcares, el crecimiento de biomasa y la producción de etanol en la fermentación de mosto de agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc), respecto al empleo de sulfato de amonio.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar un estudio a nivel laboratorio de la fermentación de mosto de agave tobalá en ausencia y presencia de glicina y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el consumo de azúcares, el crecimiento de biomasa y la producción de EtOH durante el período de fermentación.
- Establecer la influencia de la glicina y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la fermentación de mosto de agave tobalá.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diagrama de bloques. Las operaciones realizadas se presentan en la Figura 10.

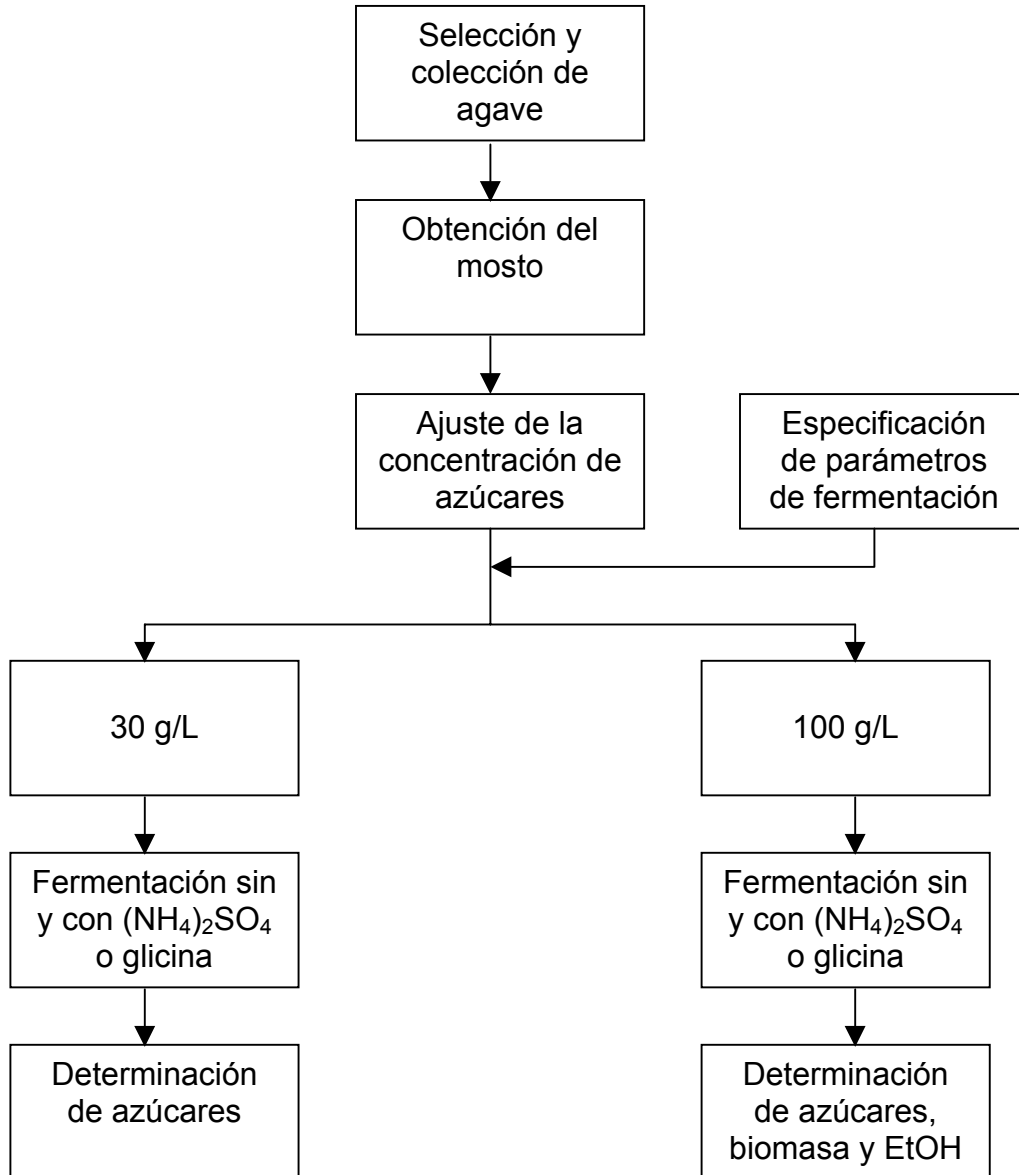


Figura 10. Diagrama de bloques para la evaluación del proceso de fermentación

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Colección y tratamiento de las plantas de agave. Los agaves se seleccionaron y colectaron dentro de la zona habitada de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, tomando en cuenta las siguientes características:

- Coloración verde-amarillenta en las pencas.
- Presencia de inflorescencias (quiote), las cuales se eliminaron.
- Ausencia de plaga y enfermedades (La presencia de una resina color rojiza indica la existencia de gusano).
- Peso de la planta entre 20 y 25 kg.

Después de la colección de las plantas, se les eliminaron las pencas, utilizándose únicamente la cabeza, cortándose en trozos.

5.2.2. Obtención del mosto. Se efectuó la cocción del agave durante 6 h a una temperatura de 121 °C y a una presión de 15 psia, utilizándose una autoclave marca Presto con capacidad de 21 L. La proporción de agua añadida fue de 5 L por 3 kg de agave.

Al finalizar la operación, se colectaron las mieles (mosto) contenidas en el agave por medio de prensado y se eliminaron sólidos suspendidos mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 3 min, utilizando una centrifugadora IEC modelo HN-SII.

Se diluyó la concentración inicial de azúcares en el mosto a 30 y 100 g/L para posteriormente esterilizarlo y conservarlo en refrigeración a 4°C.

5.2.3. Características del reactor. El reactor construido se muestra en la Figura 11 y consistió de un matraz Kitazato de 500 mL, en cuya salida lateral se colocó una manguera de hule (cánula) para coleccionar muestras.

La boca se selló con un tapón de hule bihoradado en el que se colocó un termómetro y otra cánula para permitir la descarga de dióxido de carbono.

El mezclado se realizó mediante una parrilla con agitación magnética marca Thermolyne modelo CIMAREC SP131325.

5.2.4. Establecimiento de los parámetros de fermentación. La fermentación se realizó en un intervalo de temperaturas de 20 a 25 °C con una agitación de 100 rpm. El volumen de mosto se estableció en 200 mL con una concentración de azúcares inicial de 30 g/L y 100 g/L.



Figura 11. Reactor para la fermentación de mosto

5.2.5. Preparación del mosto previo a la inoculación. Antes de efectuarse la inoculación, el mosto refrigerado se agitó durante 5 min a 300 rpm, calentándose de manera simultánea hasta alcanzar un intervalo de temperatura de 20-25 °C.

Tomando como base cantidades empleadas en la industria, se pesaron 0.5 g de cada compuesto nitrogenado ((NH₄)₂SO₄ y glicina), los cuales se añadieron por separado, siguiendo las especificaciones mostradas en la Tabla 7. Estas cantidades representaron el 30% del nitrógeno necesario para efectuar el balance de nitrógeno en el mosto con una concentración de fructosa de 30 g/L y el 9% para el balance del mosto con concentración de fructosa de 107.6 g/L (Galíndez-Mayer y Ruiz-Ordaz, 1994).

Tabla 6. Experimentos realizados y condiciones de fermentación

Serie	Experimento	Sustrato	g/L inicial de azúcares	Fuente de nitrógeno	Agitación (rpm)	Análisis realizados
1	Control	Mosto	30	Ninguna	100	Azúcares *
	Sulfato			(NH ₄) ₂ SO ₄		
	Glicina			Glicina		
2	Control	Mosto	107	Ninguna	100	Azúcares ^a Biomasa EtOH
	Sulfato			(NH ₄) ₂ SO ₄		
	Glicina			Glicina		

* Método de Dubois

^a HPLC

5.2.6. Inoculación del mosto. Experimentos realizados inoculando con 32 g de levadura (AOAC, 945.30) mostraron tiempos de fermentación demasiado cortos (5 h) y generación excesiva de espuma, por lo que la cantidad de levadura para inocular el mosto se redujo hasta 1 g. Esto permitió prolongar el tiempo de fermentación a 14 h, colectándose muestras de 7 mL cada 2 h.

5.2.7. Determinación de azúcares por colorimetría. El método se aplicó según lo reportado por Dubois (1956) utilizando un espectrofotómetro UV/Vis marca Perkin Elmer, modelo lambda 35 (Figura 12) a una longitud de onda de 490 nm.

Para eliminar la levadura contenida en la muestra colectada, se centrifugó por 3 min a 1,500 rpm en una centrifugadora marca SOL-BAT modelo J-12, y posteriormente una porción del sobrenadante se diluyó con agua destilada a una relación de 1:10000.

Con la finalidad de evaluar la confiabilidad de los resultados arrojados por la técnica de Dubois, se efectuó la fermentación de una solución de fructosa con una concentración inicial de 35 g/L y se determinó su concentración de azúcares a diferentes tiempos de fermentación.

5.2.8. Determinación de azúcares por cromatografía de líquidos (HPLC). Se utilizó un equipo de HPLC marca GBC con detector de IR (Figura 13) y equipado con una columna cromatográfica de fase amino (250 X 4.6 mm SS Exil Amino 5µm) cuya temperatura se mantuvo a 50 °C con ayuda de un horno marca Eppendorf modelo TC-50.

Se usó agua grado HPLC (J.T. Baker) como eluyente a una velocidad de flujo de 1 mL/min y a un intervalo de presión de 900-1,200 psia.

Las muestras colectadas se prepararon haciéndose pasar por membranas filtrantes de celulosa o nylon de tamaño de poro de 0.45 µm marca Agilent y se diluyeron a una concentración de 10% v/v utilizando agua HPLC (J.T. Baker). El volumen inyectado fue de 20 µL.

5.2.9. Determinación de biomasa por sólidos volátiles. Se midió un volumen de 5 mL de la muestra colectada y se filtró a vacío en un crisol Gooch equipado con un filtro de fibra de vidrio marca Sartorius, grado GMF 1. Posteriormente, se eliminó la humedad de la muestra mediante calentamiento a un intervalo de temperatura de 90-110 °C durante 2 h (horno marca RIOSSA) y finalmente se colocó en una mufla marca

Thermolyne modelo Furnace 1400FB141SM a un intervalo de temperatura de 545-560 °C durante 20 min para su calcinación.

5.2.10. Determinación de EtOH por cromatografía de gases. Se utilizó un equipo de cromatografía de gases con detector FID marca Perkin Elmer modelo Autosystem XL (Figura 13) y equipado con una columna capilar de gel de sílice recubierta con polietilenglicol (PE-WAX, 30 m x 0.250 mm 0.25 micron). Se usó helio como gas acarreador a una presión de 14.0 psia y un flujo de 14 mL/s. La temperatura del inyector se mantuvo a 150 °C y la del detector a 200 °C, en tanto que la temperatura inicial del horno se programó a 80 °C, incrementándose a una velocidad de 10 °C/min hasta alcanzar los 90 °C.

Las muestras colectadas se prepararon haciéndose pasar por membranas filtrantes de celulosa o nylon de tamaño de poro de 0.45 µm marca Agilent y se diluyeron a una concentración del 40% v/v en el caso de la hora 2; y a una concentración del 30% v/v para las horas restantes. El volumen inyectado fue de 4 µL.

5.2.11. Análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), aplicando la prueba de Dunnett con $\alpha=0.05$ para comparaciones bilaterales.

6. RESULTADOS

Los resultados de la fermentación de mosto de agave tobalá con una concentración inicial de azúcares de 30 g/L se presentan en la Gráfica 1, en donde puede observarse que el empleo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuvo una influencia importante sobre la fermentación, asimilándose una mayor cantidad de azúcares que en el mosto adicionado con glicina y en el mosto control a partir de las cuatro horas de fermentación, aprovechándose hasta el 90.9% del total entre las horas ocho y diez (Tabla 7).

Gráfica 1. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 30 g azúcar/L

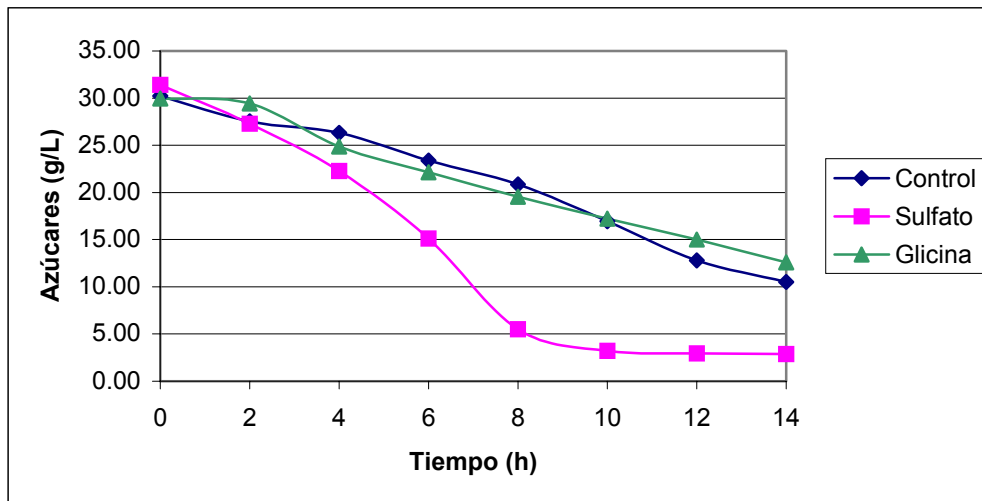


Tabla 7. Consumo de azúcares en fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 30 g azúcar/L

g/L de azúcares iniciales [σ]	Fuente de nitrógeno	g/L de azúcares finales [σ]	Consumo (%)	Prueba de Dunnet
30.2[±0.22]	Ninguna	10.5 [±0.10]	65.2	---
31.4[±0.48]	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.9 [±0.13]	90.9	7.64>0.32
29.9[±0.17]	Glicina	12.6 [±0.18]	57.9	2.09>0.32

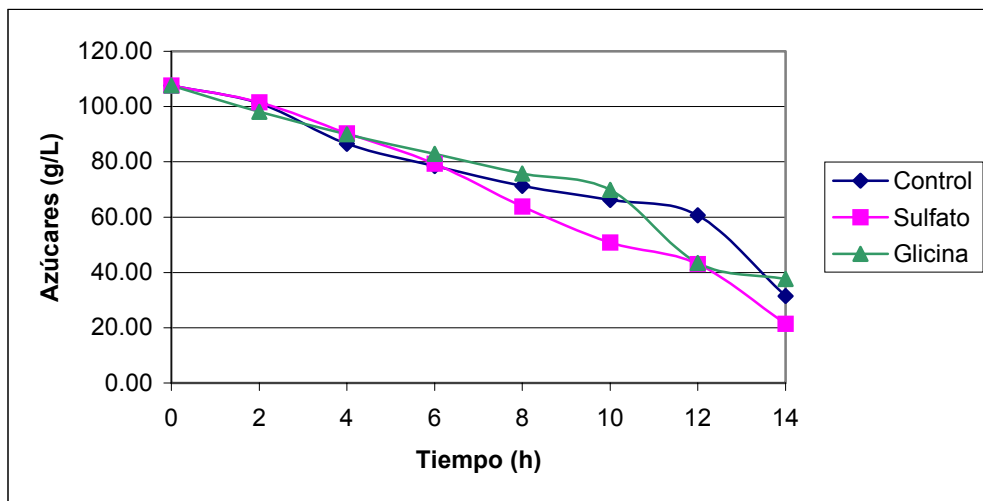
σ = Desviación estándar

El mosto adicionado con glicina mostró una asimilación de azúcares menor que al utilizar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observándose un comportamiento similar en el experimento control. No obstante, la Tabla 7 muestra que al final de la fermentación, en el mosto control existió un aprovechamiento de azúcares del 65.2%, en tanto que en el mosto con glicina solo existió un consumo del 57.9%.

Al aplicar la prueba de Dunnet, se obtuvo que el valor de la diferencia entre la concentración final de azúcares al emplear alguno de los compuestos nitrogenados y la concentración final de azúcares en el experimento control fue mayor al compararlo con un valor de referencia. Esto, en otras palabras, expresa que el empleo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o glicina produjo una diferencia significativa respecto al control en el consumo de azúcares de mosto.

La Gráfica 2 muestra los resultados de las fermentaciones de mosto de agave tobalá a una concentración inicial de azúcares de 100 g/L. En el mosto adicionado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el consumo de azúcares fue mayor que en el mosto con glicina y en el mosto control, a partir de las seis horas de fermentación. Por otra parte, en el mosto adicionado con glicina existió el menor consumo de azúcares durante la mayor parte del periodo de fermentación.

Gráfica 2. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L



En la Tabla 8 se observa que al utilizar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el porcentaje de aprovechamiento de azúcares al final del proceso fue del 71.0%, en tanto que en el mosto control y en el mosto con glicina, el aprovechamiento fue del 57.3% y del 49.0% respectivamente.

El análisis estadístico mostró que el empleo tanto de glicina como de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ produjo una diferencia significativa respecto al control al final de la fermentación.

Tabla 8. Consumo de azúcares en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L

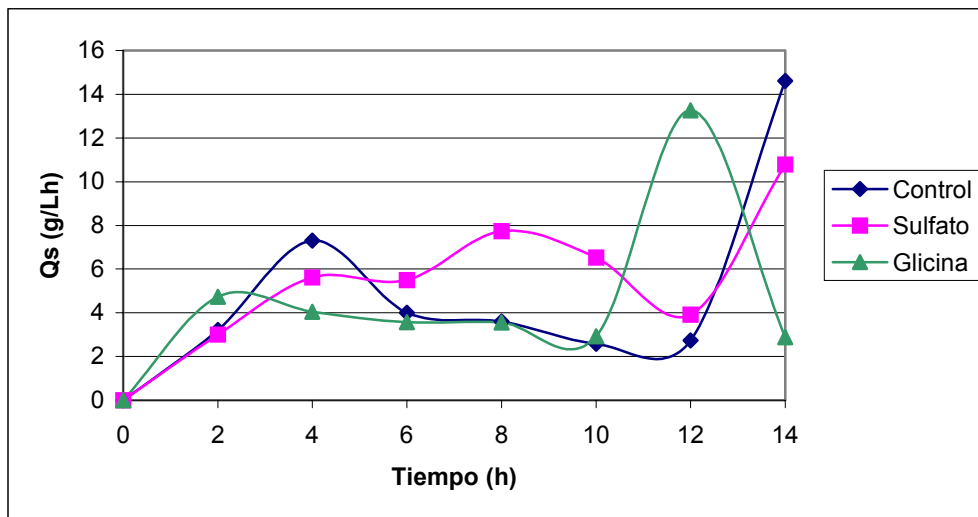
g/L de azúcares iniciales* [σ]	Fuente de nitrógeno	g/L de azúcares finales [σ]	Consumo (%)	Prueba de Dunnet
107.6 [±0.41]	Ninguna	31.5 [±0.07]	70.7	---
107.6 [±0.62]	(NH ₄) ₂ SO ₄	21.4 [±0.10]	80.0	10.06>2.09
107.6 [±0.49]	Glicina	37.6 [±1.55]	65.0	6.14>2.09

* Valor teórico

σ = Desviación estándar

Las velocidades volumétricas de consumo de sustrato (Qs) alcanzadas en cada uno de los experimentos realizados se presentan en la Gráfica 3. Al analizar el comportamiento de Qs desde el inicio de la fermentación hasta las diez horas, puede observarse que en el mosto adicionado con (NH₄)₂SO₄, Qs fue mayor que en los otros experimentos a partir de las seis horas.

Gráfica 3. Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (Qs) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L

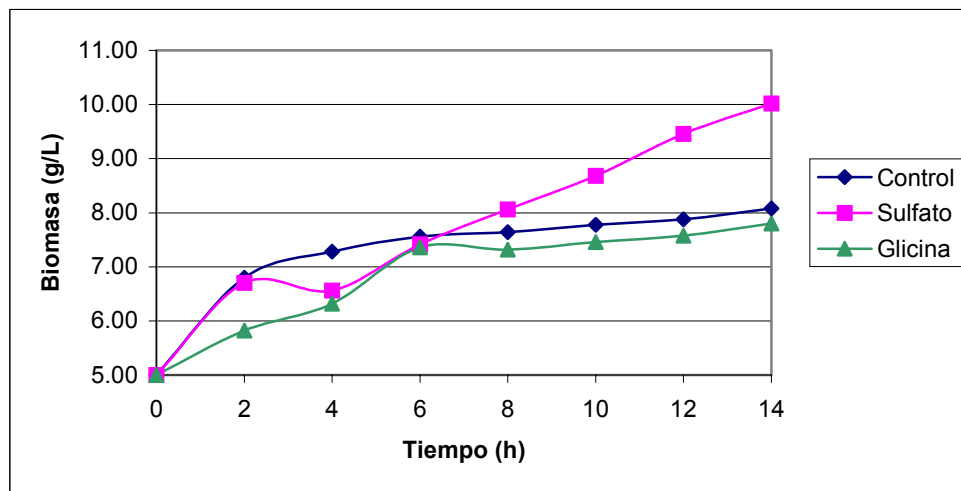


El mosto adicionado con glicina mostró un ligero incremento en Qs en las primeras dos horas de fermentación, sin embargo, presentó la Qs más baja durante la mayor parte del proceso. En el experimento control, existió un incremento importante en Qs durante las cuatro

horas de fermentación, sin embargo también se presentó un descenso considerable después de este periodo.

En la Gráfica 4 se muestra el comportamiento de la concentración de biomasa con respecto al tiempo. Puede apreciarse que, después de seis horas de fermentación, el mosto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presentó una mayor concentración de biomasa que en el mosto control y en el mosto con glicina. En este último, existió la menor concentración de biomasa durante todo el periodo de fermentación.

Gráfica 4. Crecimiento de biomasa en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L



En la Tabla 9 se observa que, al finalizar la fermentación, la concentración de biomasa en el mosto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se incrementó en un 100% respecto a su concentración inicial, en tanto que en el mosto con glicina y en el mosto control, existió un incremento del 56.0% y del 61.6% respectivamente.

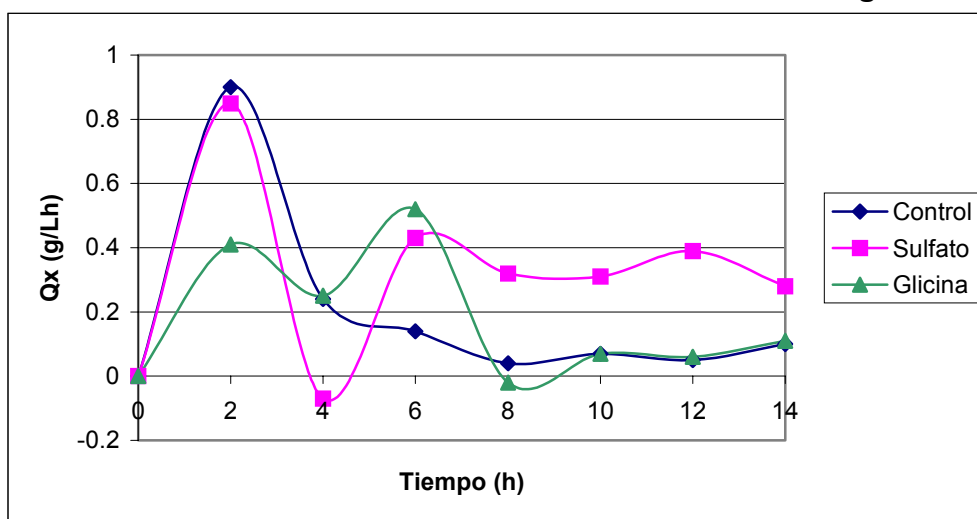
Tabla 9. Crecimiento de biomasa en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L

g/L de biomasa inicial	Fuente de nitrógeno	g/L de biomasa final	% de incremento
5.0	Ninguna	8.1	61.6
5.0	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.0	100.4
5.0	Glicina	7.8	56.0

Las velocidades volumétricas de crecimiento de biomasa (Qx) alcanzadas en cada uno de los tres experimentos se muestran en la Gráfica 5.

En las primeras dos horas de fermentación, el mosto control y el mosto con (NH₄)₂SO₄ presentaron una Qx similar, en tanto que en el mosto con glicina fue menor. A partir de seis horas, la biomasa en el mosto con (NH₄)₂SO₄ alcanzó una Qx mayor que en el mosto control y en el mosto con glicina.

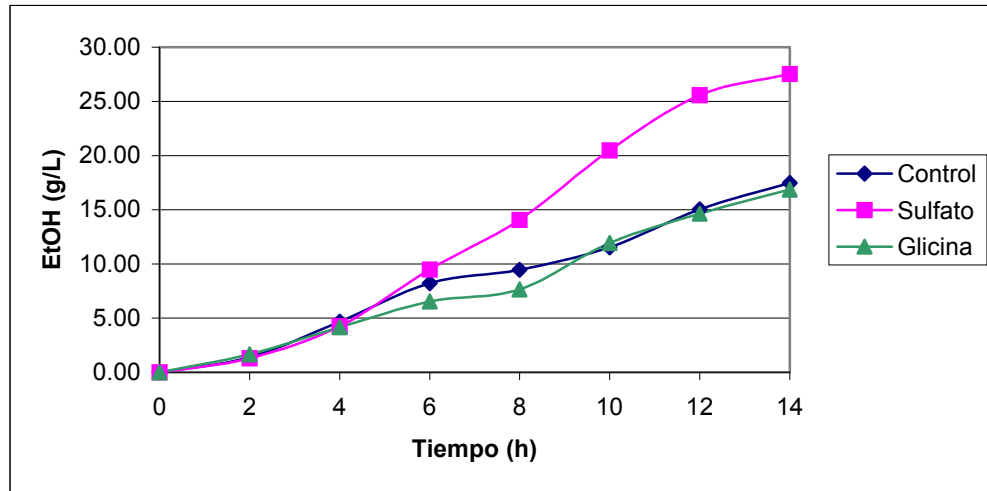
Gráfica 5. Velocidad volumétrica de crecimiento de biomasa (Qx) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L



La adición de (NH₄)₂SO₄ en el mosto tuvo efecto sobre la generación de producto, existiendo una concentración mayor de EtOH respecto al mosto adicionado con glicina y al mosto control a partir de las seis horas de fermentación según se muestra en la Gráfica 6.

También puede observarse que la concentración de EtOH en el mosto adicionado con glicina fue menor al control entre las cuatro y diez horas, presentando un comportamiento similar al finalizar la fermentación.

Gráfica 6. Generación de EtOH en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L



La Tabla 10 presenta las concentraciones de EtOH obtenidas al finalizar la fermentación. El mosto con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presentó una concentración de 27.5 g/L de EtOH, la cual fue mayor que las obtenidas en el mosto control y en el mosto con glicina.

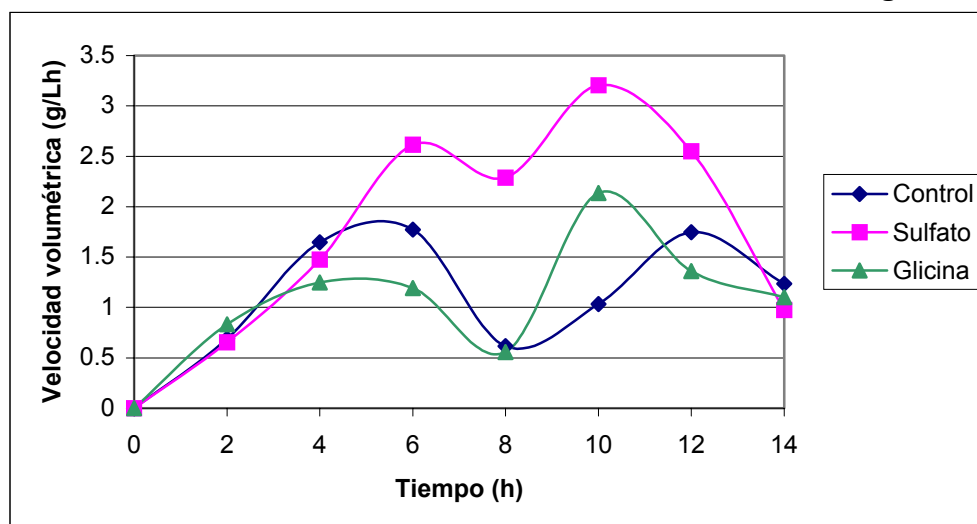
La prueba de Dunnett reveló que únicamente la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provocó una diferencia significativa en la concentración final de EtOH en la fermentación del mosto.

Tabla 10. Generación de EtOH en la fermentación de mosto de agave a una concentración inicial de 107 g azúcar/L

g/L de EtOH inicial	Fuente de nitrógeno	g/L de EtOH final	Prueba de Dunnett
0.00	Ninguna	17.48	---
0.00	(NH ₄) ₂ SO ₄	27.52	10.03>1.15
0.00	Glicina	16.86	0.63<1.15

Al efectuarse un análisis de las velocidades volumétricas de formación de producto (Qp) mostradas en la Gráfica 7, puede apreciarse que a partir de las seis horas, existe una diferencia notable en las Qp de los tres experimentos, siendo la Qp del mosto con (NH₄)₂SO₄ mayor respecto al mosto control y al mosto con glicina, manteniéndose durante la mayor parte del tiempo de fermentación. Al efectuar la comparación de Qp entre el mosto control y el mosto añadido con glicina se tiene que, a pesar de que existió una concentración de EtOH similar al término de la fermentación, no existe el mismo comportamiento en la Qp durante el desarrollo de la fermentación.

Gráfica 7. Velocidad volumétrica de generación de producto (Qp) en la fermentación de mosto a una concentración inicial de 107 g azúcar/L



7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la fermentación de mosto de agave tobalá influyó sobre la producción de biomasa y EtOH aumentando su concentración, y sobre el consumo de azúcares aumentando su porcentaje de consumo. Un efecto similar del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en mosto de agave espadín (*Agave angustifolia* Haw) fue observado por Terán-Sangermán, atribuyendo los resultados obtenidos a la fácil asimilación del nitrógeno contenido así como a un aporte de azufre adicional. Trabajos realizados por Arrizon y Gschaedler (2002) mostraron que el empleo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en combinación con otros aminoácidos, disminuyó el tiempo de consumo de azúcares, además de aumentar la cantidad de EtOH generado y el crecimiento de biomasa en mostos de agave azul (*Agave tequilana* Weber var. azul). Estos autores atribuyen el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la activación de la síntesis de proteínas, la cual a su vez tuvo efecto sobre la activación del transporte de azúcares, que guarda relación con la cantidad de nitrógeno asimilable en el medio.

Los resultados también revelaron que el uso de glicina no incrementó el consumo de azúcares, la producción de biomasa ni la generación de EtOH, encontrándose valores más bajos o similares a los obtenidos en mostos sin nitrógeno adicional. Este comportamiento ha sido reportado por Kolothumannil e Ingledew (1990) en trigo hidrolizado, en donde los experimentos adicionados con glicina presentaron un consumo de sustrato menor que un experimento control, al que no se le adicionó algún compuesto nitrogenado. La explicación que dan los autores a estos resultados es que la ausencia de oxígeno impide la conversión de la glicina en glioxilato. Transformación intracelular que, bajo condiciones aerobias, es necesaria para la asimilación del nitrógeno. Así mismo, mencionan que la presencia de ciertos aminoácidos como la lisina y la arginina pueden inhibir el crecimiento y la división celular de las levaduras. Respecto a esto último, Pirt (1975) señala la existencia de

grupos de aminoácidos que, en conjunto, inhiben el crecimiento de los microorganismos, debido a la competencia por una permeasa común. Para el caso específico de la glicina, la presencia de serina, treonina y alanina pueden provocar este efecto.

8. CONCLUSIONES

El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuvo influencia sobre la fermentación de mosto de agave tobalá, observándose las velocidades volumétricas más altas de consumo de sustrato, crecimiento de biomasa y generación de EtOH.

La glicina no incrementó la formación de EtOH, presentando además, velocidades volumétricas más bajas de consumo de sustrato y de crecimiento de biomasa.

9. PERSPECTIVAS

La información generada, amplía el conocimiento en lo que respecta a la elaboración del mezcal al mostrar el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la glicina, sobre la fermentación de mosto de agave tobalá. Sin embargo, se vuelve importante efectuar trabajos que permitan determinar la cantidad óptima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para producir las concentraciones más altas de EtOH.

También es necesario estudiar de forma comparativa, el efecto del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la fermentación de mostos obtenidos a partir de otras especies de agave, mencionadas en la NOM-070-SCFI-1994 (*Agave angustifolia* Haw, *Agave weberi* Cela, etc). Esto tendría como finalidad comparar la producción de EtOH y establecer los requerimientos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ según la especie de agave.

Finalmente, conviene verificar la existencia de alguna relación entre el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la generación de compuestos como los alcoholes superiores, aldehídos, cetonas o el glicerol. Este último, de acuerdo a Albers y col. (1996), está relacionado con una reducción en la producción de EtOH.

10. PUBLICACIONES

Esta tesis ha dado origen a tres publicaciones:

- Ortiz-Bravo E.G., Robles-González V.S., Lemus-Fuentes E. y Salas-Coronado R. (2005). “*Fermentación de Agave potatorum Zucc en presencia de glicina o sulfato de amonio*”. Revista de la Sociedad Química de México. 49, c-163, 175.
- Ortiz-Bravo E.G. y Salas-Coronado R. (2005). “*El proceso de elaboración del mezcal*”. Temas de ciencia y tecnología. 9, 45-51.
- Rames-Osorio, M. y Ortiz-Bravo E.G. (2006). “*El proceso de elaboración del mezcal y la importancia económica de la industria*”. Observatorio de la Economía Latinoamericana: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx>

BIBLIOGRAFÍA

- Albers E., Larsson C., Lidén G., Niklasson C. y Gustafsson L. (1996). "*Influence of the nitrogen source on Saccharomyces cerevisiae anaerobic growth and product formation*". Applied and environmental microbiology. 62, 3187-3195.
- AOAC International, Official Methods of Analysis of, 945.30 (1990). "*Malt Beverages and Brewing Materials*". Vol. II, edition 16th.
- Aragón Miranda, O. (1998). "*Determinación de la composición y propiedades de los mezcales de palenque de los distritos de Tlacolula y Yautepec, Oaxaca*". Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura.
- Arrizon J. y Gschaedler A. (2002). "*Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process*". Canadian Journal of Microbiology. 48, 965-970.
- Badui S. (1993). "*Química de los alimentos*". 3^a Ed. Editorial Pearson, México. 75-82, 216, 217.
- Delfini C. y Formica J. (2001). "*Wine: microbiology, science and technology*". Editorial Maecel Dekker Inc. Nueva York, Estados Unidos. 254-267, 270-282.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. y Smith F. (1956). "*Colorimetric methods for determination of sugars and related substances*". Analytical Chemistry. 28, 350-355.
- Esser K. y Schmidt U. (1982). "*Alcohol production by biotechnology*". Process Biochemistry. 17, 46-49.
- Galíndez Mayer J. y Ruiz Ordaz N. (1994). "*Bioingeniería: fundamentos biocinéticos para el diseño de procesos fermentativos*". Libro editado por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, México. 25.

- Greenfield P. F., Pamment N. y Jones R. P. **(1981)**. "*Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variables*". *Process Biochemistry*. 16, 42-49.
- Jiménez Monterrosa E. D. **(1988)**. "*Control de calidad de mezcales de Oaxaca*", Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura.
- Kolothumannil T. e Ingledew W. **(1990)**. "*Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high gravity wheat mashes*". *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 2046-2050.
- Kosaric N., Wieczorek A., Consentino G., Magee R. y Prenosil J. **(1983)**. "*Biotechnology Volume 3: Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Fenewable Resources*". Cap. 3a, 257-266.
- Lehninger, A. L. **(1995)**. "*Bioquímica*". 2ª Edición. Ed. Omega, Barcelona, España. 427-449.
- Manginot C., Sablayrolles J. M., Roustan J. L. y Barre P. **(1997)**. "*Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase*". *Enzyme and Microbial Technology*. 20, 373-380.
- Manginot C., Roustan J. L. y Sablayrolles J. M. **(1998)**. "*Nitrogen demand of different yeast strains during alcohol fermentation. Importance of the stationary phase*". *Enzyme and Microbial Technology*. 23, 511-517.
- Marcilla-Margalli, N. y López, M.G. **(2002)**. "*Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of Agave tequilana Weber var. azul*". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50, 806-812.
- Martínez-Chang A. **(1994)**. "*Producción de mezcal en Santiago Matatlán Tlacolula, Oaxaca*", Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca, México. Tesis de Maestría.

- Martínez-Ramírez Saúl. *“El maguey papalomé: propagación en vivero y establecimiento en campo”*, Universidad Tecnológica de la Mixteca. Instituto de Hidrología. Huajuapán de León, Oaxaca, México. s. e.
- Mauricio J., Valero E., Millán C. y Ortega J. **(2001)**. *“Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeast”*. Journal of agriculture and food chemistry. 49, 3310-3315.
- Metcalf-Eddy Inc. **(1985)**. *“Ingeniería sanitaria: tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales”*. 2ª Edición. Ed. Labor, Barcelona, España. 82-83, 453-469.
- Montgomery D. C. **(1991)**. *“Diseño y análisis de experimentos”*. Ed. Iberoamérica, México, México. 71-72.
- Nagodawithana T. W., Castellano C. y Steinkraus, K. H. **(1974)**. *“Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of Saccharomyces cerevisiae in rapid fermentations”*. Applied Microbiology. 28, 383-391.
- Nagodawithana T. W., Castellano C. y Steinkraus K. H. **(1976)**. *“Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in rapid fermentation”*. Applied and Environmental Microbiology. 31, 158-162.
- Narendranath N. V. y Power R. **(2005)**. *“Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and Saccharomyces cerevisiae during ethanol production”*
- NMX-21-S **(1986)**. *“Bebidas alcohólicas destiladas-determinación de metanol”*.
- NMX-V-13-S **(1986)**. *“Bebidas alcohólicas destiladas-determinación del por ciento de alcohol en volúmenes en la escala de Gay-Lussac a 288 K (15°C)”*.

- NMX-V-14-S (1986). “Bebidas alcohólicas destiladas-determinación de alcoholes superiores (Aceite de fusel)”.
- NMX-V-43 (1972). “Método de prueba para la determinación de alcohol en volumen en la escala Gay-Lussac a 15°C, en pulque”.
- NOM-070-SCFI-1994 (1994). “Bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones”.
- Ostergaard S., Olsson I. y Nielsen J. (2000). “Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*”. Microbiology and molecular biology reviews. 64, 38-41.
- Pearson D. (1986). “Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos”. Ed. Acribia, Zaragoza, España. 71-83, 87-91.
- Pinal L., Cedeño M., Gutierrez H. y Alvarez-Jacobs J. (1997). “Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process”. Biotechnology Letters. 19, 45-47.
- Pirt J. (1975). “Principles of microbe and cell cultivation”. Ed Halsted Press, Nueva York, Estados Unidos. 4-13, 117-135, 157-169.
- Pronk J. T., Steensma H. Y. y Van Dijken J. P. (1996). “Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*”. Yeast. 12, 1607-1633.
- Ramales-Osorio M. y Barragán-Ramírez M. (2002). “La industria del mezcal y la economía oaxaqueña”. Observatorio de la Economía Latinoamericana:
<http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx>.
- Tauer A., Elss S., Frischmann M., Tellez P y Pischetsrieder M. (2004). “Influence of thermally processed carbohydrate/amino acid mixtures on the fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*”. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52, 2042-2046.
- Terán-Sangermán U., Santiago-Rivera L., Vera-Guzmán A., Bautista P. B., López-Pérez M. G. y Santiago-García P. (2002). “Estudio comparativo de la fermentación natural e inducida del mosto de agave (*Agave angustifolia* Haw), en la elaboración

tradicional del mezcal". Memorias del Segundo Foro de la Agroindustria del Mezcal, Oaxaca, Oax.

- Vera-Guzmán A., Terán-Sangermán U., Bautista P. B., López-Pérez M. G. y Santiago-García P. **(2002)**. "*Evaluación química del mosto de Agave angustifolia Haw y Agave potatorum Zucc durante la fermentación en la elaboración del mezcal oaxaqueño*". Memorias del Segundo Foro de la Agroindustria del Mezcal, Oaxaca, Oax.
- Schwartzberg H. **(1992)**. "*Physical chemistry of foods*". Ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos. 599-626.
- Skoog D., Holler J. y Nieman T. **(2001)**. "*Principios de análisis instrumental*". 5ª Edición. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana, Madrid, España. 759-776, 785-800.
- Stanbury P. y Whitaker A. **(1989)**. "*Principles of fermentation technology*". Ed. Pergamon Press, Nueva York, Estados Unidos. 11-23.

ANEXO

CONSTRUCCIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

- **Determinación de azúcares por el método de Dubois.**

La curva de calibración se construyó empleando soluciones de fructosa de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm, analizándose por triplicado utilizando el espectrofotómetro UV/Vis mostrado en la Figura 12. El coeficiente de correlación fue de 99.9% con un error residual de 0.0069 (Gráfica 8).

Gráfica 8. Curva estándar para la determinación de azúcares por colorimetría

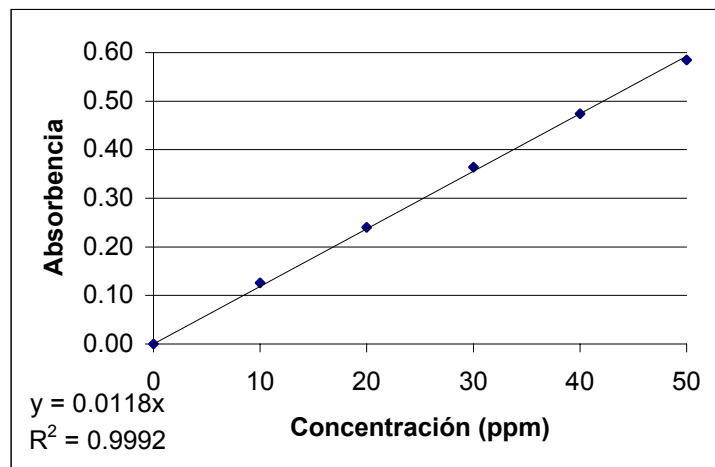




Figura 12. Equipo de espectrofotometría UV/Visible

- **Determinación de azúcares por HPLC**

La curva de calibración se construyó empleando soluciones de fructosa de 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 y 10,000 ppm, analizándose por triplicado en el equipo de HPLC mostrado en la Figura 13. Se obtuvo un coeficiente de correlación del 99.9% (Gráfica 9).

Gráfica 9. Curva estándar para la determinación de azúcares por HPLC

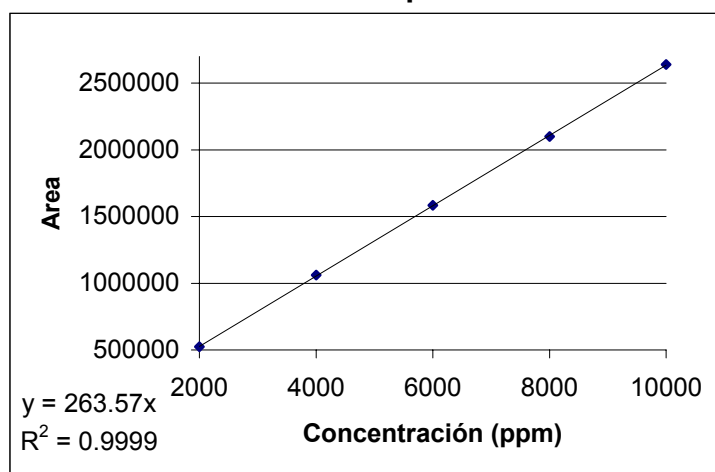




Figura 13. Cromatógrafo de líquidos

- **Determinación de EtOH por GC.** La curva de calibración se construyó empleando soluciones de EtOH de 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0 y 11.0%, analizándose por triplicado mediante el uso del equipo de GC mostrado en la Figura 14. Se obtuvo un coeficiente de correlación del 99.7% (Gráfica 10).

Gráfica 10. Curva estándar para determinación de EtOH por GC

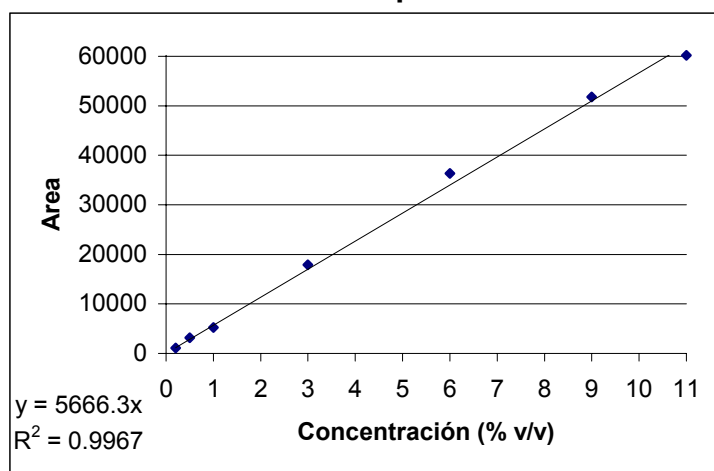




Figura 14. Cromatógrafo de gases