



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
CONCENTRACIÓN DEL NITRÓGENO SOBRE
LA COMPOSICIÓN DE LOS ALCOHOLES
SUPERIORES EN UNA FERMENTACIÓN DE
JUGO DE AGAVE.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
AIDA PINEDA VIÑAS.**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGOMEZ

VOCAL: GLORIA DÍAZ RUIZ

SECRETARIO: FRANCISCO RUIZ TERÁN

1er SUPLENTE: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

2do SUPLENTE: CARMINA MONTIEL PACHECO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

FRANCISCO RUIZ TERÁN

SUPERVISOR TÉCNICO

HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGOMEZ

SUSTENTANTE

AIDA PINEDA VIÑAS

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
3	ANTECEDENTES.....	5
3.1	Bebidas fermentadas provenientes de plantas del género Agave.....	5
3.2	Mezcal.....	5
3.2.1	Denominación de Origen.....	6
3.2.2	Tipos de Mezcal.....	7
3.2.3	Normatividad.....	8
3.2.4	Proceso de elaboración.....	8
3.2.5	Microbiota del mezcal.....	12
3.3	Levaduras.....	13
3.3.1	Participación de <i>S. cerevisiae</i> en fermentaciones de agave.....	13
3.3.2	Fermentación alcohólica.....	14
3.3.3	Importancia del nitrógeno en la fermentación.....	15
3.4	Producción de alcoholes superiores.....	16
3.5	Fundamentos analíticos.....	20
3.5.1	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	20
3.5.2	Cromatografía de gases.....	20
4	HIPÓTESIS.....	21
5	OBJETIVOS.....	21
5.1	Objetivo general.....	21
5.2	Objetivos particulares.....	21
6	METODOLOGÍA.....	22
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1	Cepas de levaduras utilizadas para la fermentación.....	23
7.2	Preparación de los medios de cultivo.....	23
7.2.1	Medio de cultivo sintético.....	23
7.2.2	Mosto de Agave angustifolia.....	24
7.3	Preparación de inóculo.....	24
7.4	Condiciones de fermentación.....	25
7.5	Muestreo y monitoreo de las fermentaciones.....	26
7.6	Medición de biomasa.....	27

7.7	Determinación de sólidos solubles totales (°Brix).....	27
7.8	Determinación de pH.....	27
7.9	Determinación de fructosa por HPLC.....	27
7.10	Determinación de etanol y alcoholes superiores por cromatografía de gases	28
7.11	Determinación de nitrógeno	29
7.12	Rendimientos.....	29
7.13	Análisis Estadístico	29
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
8.1	Producción de CO ₂ y crecimiento celular	31
8.2	Consumo de fructosa	37
8.3	Rendimiento y producción de etanol	38
8.4	Producción de alcoholes superiores.....	42
9	CONCLUSIONES	46
10	PERSPECTIVAS	47
11	BIBLIOGRAFÍA.....	48
12	ANEXOS.....	55
12.1	Anexo 1. Curva de calibración y tiempo de retención de fructosa....	55
12.2	Anexo 2. Curvas de calibración de etanol y alcoholes superiores. ..	56
12.3	Anexo 3. Cálculos de consumo de sustrato y rendimiento del producto.	58
12.3.1	Consumo de fructosa (%).....	58
12.3.2	Rendimiento de etanol con respecto al sustrato.....	58
12.3.3	Rendimiento de etanol (%)	58
12.4	Anexo 4. Análisis estadístico	60
12.4.1	Comparación de los tratamientos con 100 ppm	60
12.4.2	Comparación de los tratamientos con 200 ppm	66

1 RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la composición de los alcoholes superiores generados en la fermentación de mosto de *Agave angustifolia* y un medio sintético, por *S. cerevisiae* PE2. Se quiere determinar si existe diferencia en la cantidad y tipo de alcoholes superiores generados al cambiar la concentración de nitrógeno. También, este trabajo intenta entender si hay diferencias, dependiendo de si la fuente de nitrógeno es orgánica o inorgánica, se verá afectada la cantidad y tipo de alcoholes superiores generados.

Para ello, primero se caracterizó el mosto de agave proveniente de plantíos del estado de Oaxaca, se cuantificaron los azúcares (glucosa y fructosa) y la cantidad de nitrógeno presentes. Posteriormente, se realizaron fermentaciones en medio sintético y el mosto de agave con diferentes concentraciones de fosfato diamónico como fuente inorgánica y aminoácidos (leucina, isoleucina y valina) como fuente orgánica. Al finalizar la fermentación, se determinó el consumo de azúcares y nitrógeno, asimismo se cuantificaron el etanol y los alcoholes superiores producidos durante la fermentación.

2 INTRODUCCIÓN

Actualmente, la fabricación de bebidas alcohólicas destiladas es el uso más importante que se le ha dado a diversas plantas del género *Agave* (Herrera, 2008). En los últimos años, el mezcal ha llegado a ser la segunda bebida destilada más importante en México debido a su nivel de producción y consumo, precedido únicamente por el Tequila (Cedeño, 1995). El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, que se elabora de manera similar al tequila; ambas son obtenidas por medio de la fermentación alcohólica, con levaduras, y destilación de mostos extraídos de las cabezas maduras de las plantas de agave.

Mientras que el tequila solamente puede producirse a partir de la especie *Agave tequilana* (NOM-006-SCFI-1994), en el caso del mezcal, la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 indica que las variedades más empleadas en su elaboración son: *Agave angustifolia* (maguey espadín); *Agave esperrima* (maguey de cerro, bruto o cenizo); *Agave weberi* (maguey de mezcal); *Agave Patatorum* (maguey de mezcal); *Agave Salmiana* (maguey verde o mezcalero); y *Agave potatorum* (maguey de mezcal). Otra diferencia destacable entre el mezcal y el tequila es que las zonas geográficas que cuentan con Denominación de Origen para el mezcal están más dispersas en el territorio mexicano, mientras que en el caso de tequila la región es más reducida, lo que agrega un factor de variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región (Molina-Guerrero *et al.*,2007).

Para obtener mezcal, es necesario que se lleve a cabo un proceso conocido como fermentación alcohólica, en el que los azúcares se biotransforman en etanol; este proceso involucra una gran diversidad de microorganismos, destacando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a su alta tolerancia en presencia de altas concentraciones de etanol. Aunque la producción de etanol es atribuida principalmente a *S. cerevisiae*, la microbiota nativa de bacterias y levaduras del agave le confiere propiedades organolépticas, como aroma y sabor, al mezcal de cada región (De la Torre, 2010).

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas provienen de la mezcla de diversos compuestos volátiles y no-volátiles, la cual define sus atributos sensoriales (López, 1999; Vallejo y González, 1999; Cole y Noble, 1997). Estos compuestos pueden tener origen a lo largo del proceso de elaboración del mezcal: a) Pueden estar contenidos en los agaves, lo cual varía entre especies, regiones geográficas y condiciones de cultivo; b) Pueden generarse durante la fermentación dependiendo de la cepa empleada, las características del mosto y las condiciones del proceso; c) Pueden generarse durante la maduración del producto, en caso de que exista una (Pinal *et al.*, 1997; Cole y Noble, 1997).

En el mezcal los principales compuestos aromáticos son el etanol y los alcoholes superiores, conocidos también como volátiles mayoritarios (Lachenmeier *et al.*, 2007; De León-Rodríguez *et al.*, 2006). Los principales alcoholes superiores encontrados durante la fermentación de mostos de *Agave angustifolia* son n-propanol, 2-metil-propanol (isobutanol), 2-metil-butanol (amílico), 3-metil-butanol (isoamílico) (Vera *et al.*, 2009). Si los alcoholes superiores se encuentran en cantidades mayores a las establecidas, generan cambios en las propiedades sensoriales, además de ser considerados tóxicos, por lo que están regidos por la norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1994. Esta norma regula los niveles del 1-propanol, isobutanol, 2-butanol, alcohol amílico e isoamílico, que en conjunto no pueden exceder 400 mg en 100 mL de alcohol anhidro.

La mayor parte de los alcoholes superiores son producidos mediante la ruta de *Ehrlich*, en la que se muestra la síntesis de alcoholes superiores a partir de aminoácidos realizado por las levaduras (Hidalgo, 2010). Es por eso que la cantidad de nitrógeno asimilable presente durante la fermentación tiene un papel importante, además de la duración y desarrollo en el proceso de fabricación, en las propiedades organolépticas obtenidas en las bebidas alcohólicas.

Al presentarse una relación alta de carbono/nitrógeno, se favorece la generación de alcoholes superiores (Pinal *et al.*, 1997) debido a la presencia de grupos amino que pueden enlazarse a los α -cetoácidos para poder generar alcoholes superiores mediante la vía anabólica (Walker, 1999; Ter Schure *et al.*, 1998). Sin embargo, es importante tomar en cuenta que, al presentarse una deficiencia de nitrógeno, se puede causar aletargamiento o detención de la fermentación, además de alcanzarse la biosíntesis máxima de los alcoholes superiores (principalmente los alcoholes amílicos). Al obtener una gran cantidad de estos compuestos, se corre el riesgo de rebasar los límites establecidos en la norma, teniendo que recurrir a una segunda destilación para disminuir su contenido. Esto tendrá repercusión tanto en la duración como en la cantidad de energía empleada en el proceso, afectando así los costos de producción (Arrizon y Gschaedler, 2006).

Con base en lo mencionado anteriormente, se puede inferir que la cantidad de alcoholes superiores presenta una dependencia con la cantidad de nitrógeno presente en el mosto durante la fermentación. Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la concentración y el tipo de fuente de nitrógeno sobre la composición y cantidad de alcoholes superiores generados durante la fermentación de mosto de *Agave angustifolia* y medio sintético.

3 ANTECEDENTES

3.1 Bebidas fermentadas provenientes de plantas del género Agave

Desde la época prehispánica, los *agaves* o *magueyes* han proporcionado a los mexicanos valiosos recursos económicos, destacando las bebidas alcohólicas (Diguet, 2005). México cuenta con una gran variedad de agaves debido a sus características climáticas, particularmente en la Meseta Central. Hay 26 estados de la República Mexicana en los que actualmente se cultiva agave. Este se utiliza principalmente para la producción de tequila (*A. tequilana* Weber variedad azul), mezcal (*Agave Salmiana*), pulque (principalmente de *atrovirens*), y para la obtención de larvas (conocidas como gusanos de maguey); estas últimas son muy apreciadas en gastronomía (Castro y Guerrero, 2013).

En los últimos treinta años, las bebidas alcohólicas derivadas del agave han pasado del ámbito regional al reconocimiento de los mercados nacionales e internacionales. Esta creciente demanda junto con la globalización, están obligando a las empresas de la cadena de bebidas alcohólicas provenientes de agave (tequila, mezcal, bacanora, raicilla, comiteco, sotol y pulque) a integrar nuevas tecnologías para obtener una mayor competitividad, mejores precios y una óptima calidad de sus productos (Contreras y Ortega, 2005).

3.2 Mezcal

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, producto de la fermentación alcohólica con levaduras de los azúcares extraídos de la piña cocida de diferentes agaves como el *A. salmiana* (Verdugo *et al.*, 2011) y *A. angustifolia*, *A. esperrima*, *A. weberi* y *A. potatorum* entre otros (Molina-Guerrero *et al.*, 2007).

3.2.1 Denominación de Origen

El 17 de agosto de 1994 en el Diario Oficial de la Federación se publicó la declaración de protección de la denominación de origen “Mezcal” para la siembra, cultivo y extracción de los géneros de agave con los que se elabora la bebida, comprendidos en la NOM-070-SCFI-1994, en los estados de Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas y en Oaxaca particularmente la denominada “Región del Mezcal”. Se incluyen también algunas regiones de Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Puebla (Figura 1). El principal estado productor de Mezcal es Oaxaca con más del 65% de la producción nacional (Secretaría de Economía, 2016). Es importante establecer que cada Estado presenta características propias derivadas de la variedad del agave y del proceso utilizado, lo que permite su identificación y distinción con otras bebidas nacionales o extranjeras.



Figura 1. Estados Incluidos en la Denominación de Origen del Mezcal. Durango (1), Zacatecas (2), San Luis Potosí (3), Tamaulipas (4), Guanajuato (5), Michoacán (6), Guerrero (7), Oaxaca (8) y Puebla (9). Fuente: Consejo Regulador del Mezcal, 2016.

3.2.2 Tipos de Mezcal

De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1994, está permitido adicionar hasta un 20% de otros azúcares en la preparación de los mostos, siempre y cuando no se eliminen los azúcares provistos por el agave, los cuales le dan las características a ese producto. Considerando esto, existen dos tipos de mezcal:

- Tipo I. Mezcal 100% agave: Producto obtenido de los mostos que exclusivamente contienen azúcares provenientes de los agaves que se indican en la Norma Mexicana, siendo joven, reposado o añejo, pudiendo ser abocado.
- Tipo II. Mezcal: Producto obtenido de los mostos de los agaves que se indican en la Norma Mexicana y a los que se les ha adicionado hasta un 20% de otros azúcares, conforme a la fracción anterior, siendo joven, reposado o añejo, pudiendo ser abocado.

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el mezcal se clasifica en 3 categorías: añejo o añejado, joven y reposado. El mezcal añejo tiene un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble blanco o encino. El mezcal joven es el producto obtenido conforme al proceso declarado en la NOM-070-SCFI-1994, y puede ser abocado. El abocado es el procedimiento mediante el cual se intenta suavizar el sabor del mezcal, añadiendo uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes, el más conocido de ellos es el mezcal abocado con gusano de maguey. El mezcal reposado es el que por lo menos se deja 2 meses en recipientes de madera para su estabilización.

3.2.3 Normatividad

En la Norma Oficial Mexicana referente al mezcal (NOM-070-SCFI-1994) se establecen las siguientes especificaciones físicas y químicas que debe cumplir esta bebida (Tabla 1).

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas del mezcal.

ESPECIFICACIONES	MÍNIMO	MÁXIMO
% de alcohol en volumen a 20°C	36.0	55,0
Extracto seco g/L	0.2	10.0
Miligramos por 100 centímetros cúbicos referidos a alcohol anhidrido		
Acidez total (como ácido acético)		170.0
Alcoholes superiores	100.0	400.0
Metanol	100.0	300.0

3.2.4 Proceso de elaboración

Un número importante de especies de *Agave* es destinado a la elaboración de mezcal. Esta es una actividad económica que resulta potencial de desarrollo de las regiones productoras de agave (García-Herrera *et al.*, 2010). El proceso para la elaboración del mezcal es muy similar al del tequila, con la diferencia de que este proceso es artesanal y se pueden utilizar varias especies de agave para su elaboración (Castro *et al.*, 2013).

Es recomendable utilizar el maguey cuando adquiere una edad entre los 7 y los 12 años, ya que se encuentra en su punto de madurez fisiológica, lo cual depende de la especie y de las condiciones a las que hayan sido expuestos. En este periodo el maguey llega a su madurez para iniciar su reproducción sexual que se caracteriza por la emisión del escapo floral o “quiote” (García-Herrera *et al.*, 2010).

Si se cosecha el maguey tierno, antes de que llegue a su madurez fisiológica, tendrá pocos azúcares, el rendimiento será bajo y el mezcal tendrá un mal sabor. Lo óptimo es tener un maguey maduro capado que se deja sazonar por varios meses (de 12 a 18 meses), lapso en que se concentran los azucares, lo cual facilitará la obtención de mezcales de mejor calidad y sabor (García-Herrera *et al.*, 2010).

Una vez que el maguey está en sazón, se procede con las etapas contenidas en el proceso para elaborar el mezcal. El proceso consta de las siguientes operaciones unitarias: jimado del maguey, cocción de la piña, molienda de la piña cocida, fermentación, destilación, y maduración en algunos casos (García-Herrera *et al.*, 2010; Diguet, 2005).

Desvirado o Jimado. Es llamado desvirado (región altiplano potosino-zacatecano y norte) labrado (Oaxaca y Guerrero) o jimado (*Agave tequilana* en Jalisco), este se realiza con una cuchilla o barra de hierro, o bien la coa de la jima (Figura 2). Primero se cortan todas las hojas o pencas, luego se desprende la cabeza (o piña) en su parte basal, cortando el cuello (tallo) de la planta al ras del suelo (García-Herrera *et al.*, 2010).



Figura 2. Proceso de desvirado o Jimado del maguey (Barrera *et al.*, 2012).

Cocción. Al ser el mezcal una bebida elaborada artesanalmente, el cocimiento de las piñas se realiza en un horno que es una cavidad cónica de un diámetro aproximado de 2.5-3.5 metros cavado en la tierra. Estos suelen ser alineados con piedras calientes, hojas de agave, petate y tierra que permiten la cocción de la piña durante tres a cinco días (Figura 3).



Figura 3. Cocción de piñas de agave en un horno tradicional. (De la Torre, 2010).

Esta etapa tiene la función de hidrolizar a la inulina (principal polisacárido presente en la piña de agave) y a los fructanos (polímeros de fructosa), obteniendo azúcares simples, principalmente fructosa; aunado a que las fibras del agave se ablandan facilitando la molienda y la extracción del jugo (Illsley *et al.*, 2004; De la Torre, 2010). También ocurren reacciones de caramelización que forman compuestos como furanos y piranosas, muchos de ellos volátiles, siendo los principales el 5-hidroximetilfurfural (HMF) y el hidroxiacetilfurano (HAF) (Mancilla y López, 2002). El sobrecalentamiento de los azúcares incrementa la concentración de HMF dando un sabor a ahumado y el exceso de caramelización reduce el rendimiento de etanol (Cedeño, 1995).

Molienda. Las piñas cocidas se colocan en molinos conformados por una rueda de piedra sujeta a un poste mediante una viga llamado trapiche, lo que permite el desplazamiento de la rueda, produciendo así la molienda. En algunos lugares de Oaxaca y Guerrero la molienda se realiza de manera manual con un mazo en *canoas* de madera. El maguey cocido se corta, se pasa a la canoa y se golpea, con lo que el jugo dulce sale de la canoa (Figura 4). El principal producto obtenido es el mosto dulce, mientras que el subproducto generado es el bagazo, que representa cerca de un 40% del peso total (Illsley *et al.*, 2004; De la Torre, 2010).



Figura 4. Molienda de las piñas cocidas en una tahona tradicional de madera.

Fuente: Archivo fotográfico de Francisco Ruíz Terán.

Fermentación. En esta etapa se agrega agua y se mezcla con el maguey para ajustar la cantidad de sólidos disueltos que puede ir de 7 a 10 °Brix. Este proceso implica la degradación de azúcares, la cual trae consigo la producción de etanol mediante la fermentación alcohólica, realizada por las rutas metabólicas de las levaduras. Existen dos tipos de fermentaciones principales: la natural y la inducida o acelerada, siendo la primera llevada a cabo por los microorganismos presentes en la piña, mientras que en la inducida se agrega un inóculo de microorganismos, o bien sales con nitrógeno, como la urea, que favorecen el desarrollo de los microorganismos ya presentes en el mosto (Arrizon y Gschaedler, 2002; García-Herrera *et al.*, 2010).

Destilación. Se efectúa en alambiques de cobre, constituidos por cuatro elementos de cobre, metal caracterizado por su alta conductividad térmica, lo que permite la adecuada separación del etanol. Los destiladores artesanales son calentados por medio de leña y cuentan con un serpentín de cobre a través del cual se evapora el mezcal y posteriormente se condensa al enfriarse el serpentín. El destilado obtenido se recoge en recipientes de cobre o acero inoxidable (Illsley *et al.*, 2004; De la Torre, 2010).

3.2.5 Microbiota del mezcal

Para poder elaborar bebidas alcohólicas a partir de agave, la etapa de fermentación involucra poblaciones mixtas de bacterias (lácticas y acéticas) y levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*). Esta microbiota es responsable de la producción de la mayoría de los compuestos que confieren propiedades organolépticas al producto obtenido (Lappe *et al.*, 2008)

En su investigación, Verdugo *et al.* (2011) detectaron la presencia en *Agave salmiana* de 192 colonias de levaduras, de las cuales se identificaron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomyces exiguus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia kluyveri* y *Candida ethanolica*, entre otras. Estas levaduras convierten los azúcares a etanol en una proporción de 0.39 g/g en la primera fermentación y un valor similar en la segunda.

3.3 Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariontes clasificados en el reino Fungi, aunque algunas especies pueden volverse del tipo multicelular mediante la formación de cadenas de células en gemación conocidas como pseudohifas. Las levaduras forman colonias pastosas sobre los medios de cultivo, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen tener formas alargadas, esféricas, elipsoides u ovoide (Kurtzman *et al.*, 2011).

Las levaduras utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía, su fuente de carbono proviene comúnmente de azúcares simples como glucosa y fructosa o disacáridos como sacarosa y maltosa. Pueden requerir oxígeno, siendo aerobias estrictas; o bien tener un metabolismo fermentativo y ser anaerobias facultativas (Carrillo y Audisio., 2007).

A lo largo del tiempo, las levaduras se han utilizado en la producción, enriquecimiento y preservación de diferentes alimentos. Su importancia se debe a que se emplean en diversos procesos fermentativos, se utilizan en la producción de: etanol, diferentes proteínas y hormonas, colorantes naturales, vitaminas del complejo B, entre otros (Astromoff, 2000).

3.3.1 Participación de *S. cerevisiae* en fermentaciones de agave

Saccharomyces es un microorganismo unicelular que pertenece al grupo de los ascomicetos. Las células presentan formas ovaladas, esféricas o cilíndricas y su división celular es por gemación, por lo que pueden estar en agrupaciones de dos, cadenas cortas o racimos, o bien sin agruparse. La relevancia comercial de este género de levaduras radica en su utilización en el proceso de elaboración del pan y de la mayoría de las bebidas alcohólicas. Esta levadura fermenta y asimila la glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y fructosa (Madigan *et al.*, 2009; García *et al.*, 1993; De la Torre, 2010).

Desde el punto de vista funcional, algunas características importantes de *Saccharomyces cerevisiae* son: capacidad de flocular, capacidad para producir etanol, capacidad de tolerar altas concentraciones de etanol, tolerancia a la osmolaridad del medio, vigor en la fermentación de azúcares y capacidad para producir congenéricos (Madigan y Parker, 2009).

3.3.2 Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso oxidativo en el que algunos azúcares son convertidos en energía celular, liberando etanol y dióxido de carbono como productos de desecho metabólico.

El primer paso en el proceso de fermentación es la glucólisis, proceso en el cual la glucosa se convierte en piruvato o ácido pirúvico mediante una secuencia de reacciones mediadas por enzimas. En vez de que el piruvato obtenido entre al ciclo de Krebs y sea oxidado completamente, en la fermentación alcohólica ocurre una descarboxilación para formar acetaldehído; este compuesto sufre una reducción para poder convertirse en etanol (Figura 5) (Berg *et al.*, 2007).

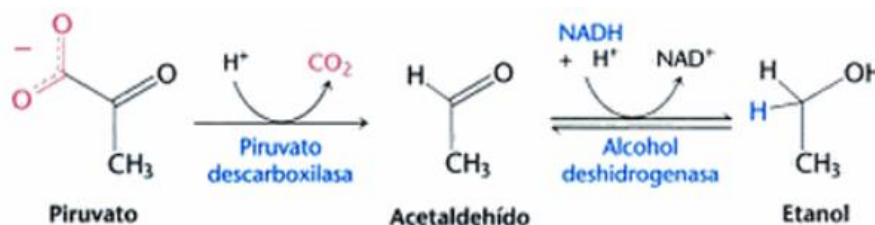


Figura 5. Proceso de obtención de etanol a partir de piruvato.

La conversión de glucosa en etanol es un ejemplo de fermentación alcohólica. En esta ruta se convierte una mol de glucosa en dos moles de etanol, dos moles de dióxido de carbono y dos moles de ATP (Figura 6). La reacción global de este proceso anaeróbico es:



Figura 6. Reacción global de la fermentación alcohólica (Berg *et al.*, 2007).

Durante la fermentación uno de los productos, el CO₂, se libera constantemente, mientras que el etanol se acumula. Si la proporción de alcohol en el líquido llega a cierto nivel, inhibe la actividad de la levadura, a pesar de que no todo el azúcar haya sido fermentado. Es por eso que la tolerancia en presencia de etanol es una de las características más destacables de la levadura empleada; por lo general oscila entre 15% y 18%.

3.3.3 Importancia del nitrógeno en la fermentación

La cantidad de nitrógeno asimilable juega un papel importante en la duración y desarrollo del proceso ya que, además de influir en la velocidad de la fermentación, es precursor de algunos compuestos volátiles y constituyente esencial de proteínas y ácidos nucleicos. Por lo tanto, el mayor consumo de nitrógeno se asocia con una mayor producción de compuestos aromáticos (Molina *et al.*, 2007; Arrizon y Gschaedler, 2006; Pinal *et al.*, 1997; Albers *et al.*, 1996). Las levaduras pueden asimilar compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, ya sea orgánicos como péptidos y aminoácidos, o inorgánicos como sales de amonio o urea (Joslyn, 1951).

La deficiencia de nitrógeno puede causar aletargamiento o incluso detención de la fermentación. Se ha reportado que, en las levaduras carentes de amonio, el crecimiento y la viabilidad de la levadura decrece (Salmon, 1989, Wang *et al.*, 2003; Bohlscheid *et al.*, 2007). Por lo tanto, se ajustan las concentraciones para que el mismo no se encuentre en forma limitante. El nitrógeno es suplementado normalmente en forma de sales de amonio (como sulfato o fosfato), urea o aminoácidos (ya sean solos o combinados) (Fermentis, 2010). Se ha reportado que estos ayudan exitosamente a evitar los problemas mencionados anteriormente pero sólo resultan eficaces durante la fase temprana de crecimiento (Salmon, 1989, Munoz e Ingledew, 1989; Arrizon y Gschaedler, 2002).

De acuerdo con diversas investigaciones, se asume que una fermentación alcohólica de un mosto de agave debe transcurrir con un mínimo de 150 ppm de nitrógeno. No obstante, para lograr buena seguridad fermentativa, se sugiere trabajar con 150 - 200 ppm de nitrógeno. Es importante aclarar que la demanda de nitrógeno está también determinada por la cepa de levadura. Algunas cepas requieren más nitrógeno que otras.

La cantidad de nitrógeno presente durante la fermentación también afecta a la biomasa. Se ha observado que el aumento de biomasa es proporcional al aumento de concentración de nitrógeno hasta llegar a una concentración a partir de la cual ya no aumenta esta biomasa; es decir sería la concentración mínima de nitrógeno para obtener la biomasa máxima (*Nitrogen Reference Value*, NRV).

3.4 Producción de alcoholes superiores

En la fermentación espontánea, las levaduras presentes en el agave compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos entre los que se encuentran los compuestos volátiles. Los compuestos volátiles comúnmente son asociados con las propiedades organolépticas, sensoriales, aromáticas y el sabor de esta bebida (Vallejo-Cordoba *et al.*, 2004); cuyo contenido y concentración en los destilados, se sugiere que son producidos por la o las levaduras contenidas naturalmente o adicionadas en la fermentación del mosto de agave (Diaz-Montaña, *et al.*, 2008).

Las levaduras son las encargadas de la producción de diversos compuestos volátiles tales como el 1-propanol, 1-butanol y los alcoholes amílico e isoamílico, entre otros, que son los principales responsables del sabor y aroma en el mezcal (Arellano, 2011). La formación de estos compuestos depende de, además de la especie, de la cepa. Por lo tanto, el resultado de cada fermentación puede ser diferente según las particularidades genéticas y fisiológicas de las levaduras sometidas a diferentes condiciones ambientales de fermentación (Suárez, 2004).

Los alcoholes de Fusel también llamados alcoholes superiores son una mezcla de alcoholes de alto peso molecular, es decir, que contienen dos o más átomos de carbono en su estructura, que se forman en pequeñas cantidades durante la fermentación. La concentración de alcoholes superiores varía entre 0.1 y 0.7% en relación con el etanol producido. Los mayores componentes del aceite de Fusel son alcohol isoamílico (59.65 %w/w), isobutanol (17.02 %w/w), n-propanol (12.92 %w/w) y alcohol amílico (10.36 %w/w) (Pérez, 2012). Sin embargo, los principales alcoholes superiores encontrados durante la fermentación de mostos de *Agave angustifolia* son n-propanol, 2-metil-propanol (isobutanol), 2-metil-butanol (amílico) y 3-metil-butanol (isoamílico) (Vera *et al.*, 2009).

Se sabe que la leucina, la isoleucina y la valina dan origen a los alcoholes isoamílico, amílico e isobutílico respectivamente (Figura 9). El n-propanol, a diferencia de los anteriores se forma a partir de un aminoácido polar no cargado: le treonina (Santillán-Valverde y García-Garibay, 1998).

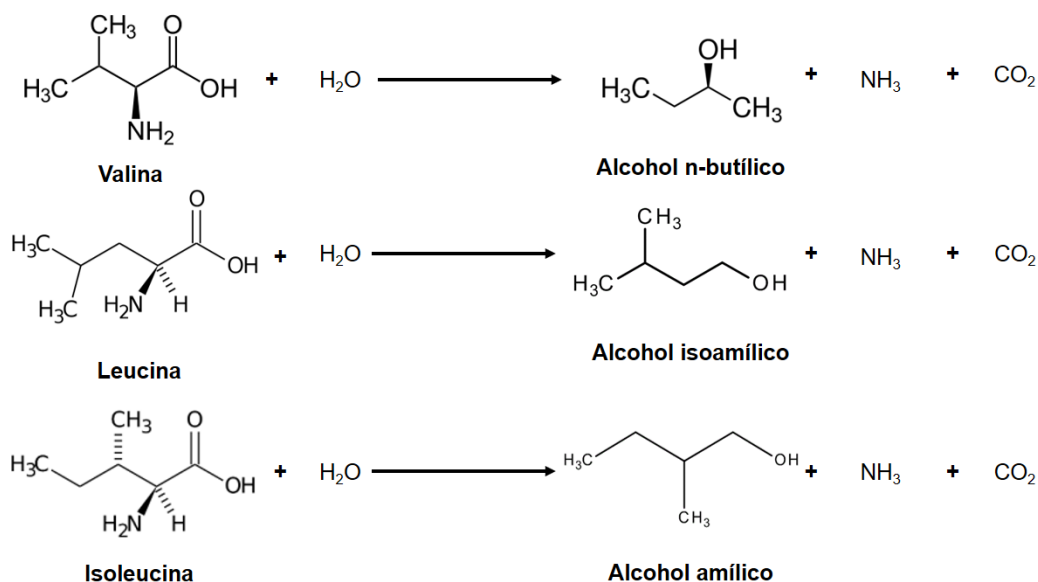


Figura 9. Relación de los alcoholes superiores con sus aminoácidos precursores.

Teniendo en cuenta la relación entre los aminoácidos y los alcoholes superiores, se considera que la cantidad de nitrógeno debe ser justo la ideal para evitar deficiencia o exceso, lo que tendrá repercusión en la generación de estos alcoholes.

Al presentarse una relación alta de carbono/nitrógeno, se favorece la generación de alcoholes superiores (Pinal *et al.*, 1997) debido a la presencia de grupos amino que pueden enlazarse a los α -cetoácidos para poder generar alcoholes superiores mediante la vía anabólica (Walker, 1999; Ter Schure *et al.*, 1998). Sin embargo, con una deficiencia de nitrógeno amoniacal en el medio, se alcanza la biosíntesis máxima de los alcoholes superiores (principalmente los alcoholes amílicos). Esto debido a que las levaduras obtienen nitrógeno amoniacal mediante la desaminación de los aminoácidos presentes en el medio, que libera también ácidos cetónicos que se transforman después en alcoholes superiores mediante la ruta de Ehrlich (Walker, 1999; Ter Schure *et al.*, 1998).

Estos alcoholes son beneficiosos organolépticamente a bajas concentraciones, confiriendo una gran variedad de aromas vegetales y de sensaciones de dulzor y suavidad. Sin embargo, en la producción de algunas bebidas destiladas, se consideran impurezas si su concentración es lo suficientemente elevada como para rendir un desagradable sabor y olor penetrante en el producto (Posada, 1968), así como aportar una sensación de aspereza al paladar (Benvenisty y Eden, 2000); adicional a esto, se les atribuye ser los causantes del dolor de cabeza, irritación y malestar que aparecen tras una ingestión considerable de bebidas alcohólicas (Murtagh, 1995; Suzzy *et al*, 1998).

Al obtener una gran cantidad de alcoholes superiores, se corre el riesgo de rebasar los límites establecidos en la norma, teniendo que recurrir a una segunda destilación para disminuir su contenido. Esto tendrá repercusión tanto en la duración como en la cantidad de energía empleada en el proceso, afectando así los costos de producción (Arrizon y Gschaedler, 2006).

3.5 Fundamentos analíticos

3.5.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una de las técnicas de análisis químico y purificación de compuestos más utilizadas hoy en día, su popularidad se debe a su alta sensibilidad y su fácil adaptación. La separación de compuestos consiste en un proceso de migración diferencial, en el cual los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria (Anaya *et al.*, 2001).

Al atravesar, la muestra y la fase móvil, la fase estacionaria se dan dos tipos de equilibrios debido a las interacciones entre cada uno de los componentes. Estas interacciones son las responsables del grado de afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por cualquiera de las dos fases. Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se retienen un mayor tiempo y tardan más en eluir, mientras que los compuestos que presentan mayor afinidad a la fase móvil se retienen un menor tiempo, eluyendo más rápido (Ramírez, 2004).

3.5.2 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases, al igual que la cromatografía de líquidos de alta resolución, es un método de análisis en el que los componentes se distribuyen en dos fases; con la diferencia que, en esta última, la fase móvil es un gas. La muestra es vaporizada, inyectada a la columna y transportada a la columna por un gas acarreador (inerte). Los componentes de la muestra inyectada son separados basándose en su presión de vapor relativa y su afinidad por la fase estacionaria (Reyes, 2006).

La identificación de cada componente registrado se hace por medio de los tiempos de retención que muestra cada uno al atravesar la columna. Estos tiempos se correlacionan con los componentes mediante la inyección de los mismos en forma pura y en las mismas condiciones de la muestra, midiendo también el tiempo de retención en esas condiciones (Medina, 2008).

4 HIPÓTESIS

Si la levadura *Saccharomyces cerevisiae* participa en la producción de distintos alcoholes superiores a partir de fuentes de nitrógeno durante la fermentación alcohólica, entonces al variar la concentración y fuente de nitrógeno, la concentración y composición de los alcoholes superiores se verá afectada.

5 OBJETIVOS

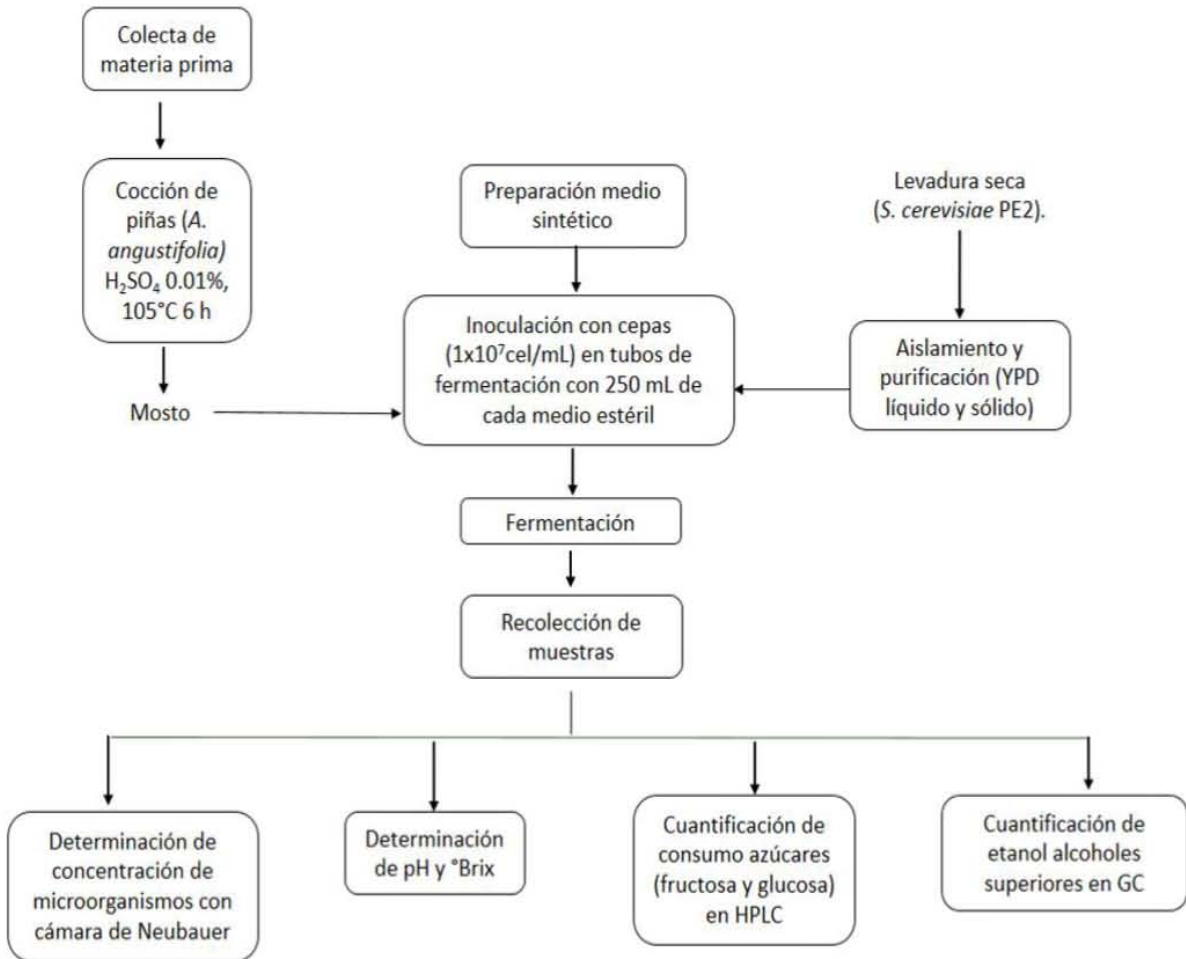
5.1 Objetivo general

Evaluar la producción y composición de los alcoholes superiores generados durante la fermentación de medio sintético y mosto de *Agave angustifolia* adicionados con diferentes concentraciones y fuentes (orgánica o inorgánica) de nitrógeno.

5.2 Objetivos particulares

- Relacionar el consumo de azúcar (fructosa) con el rendimiento de etanol durante la fermentación.
- Evaluar el efecto de las fuentes de nitrógeno en la cantidad de biomasa generada durante la fermentación.
- Relacionar la fuente de nitrógeno (orgánica e inorgánica) con la producción de alcoholes superiores durante la fermentación.
- Evaluar el efecto del exceso y la falta de nitrógeno en los alcoholes superiores generados durante la fermentación.

6 METODOLOGÍA



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas de levaduras utilizadas para la fermentación

Para este estudio se empleó la cepa comercial de *S. cerevisiae* PE2, debido a que su presentación es un liofilizado, se hidrató con agua destilada y estéril durante un periodo de 10 minutos. Posteriormente, se realizó un aislamiento y purificación mediante el uso de medio extracto de levadura peptona dextrosa (YPD por sus siglas en inglés) para comprobar que las colonias estaban puras. Primero se sembró en medio sólido YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% y agar bacteriológico 1.5%), posterior a esto, se observaron dos diferentes tipos de colonia y se purificaron mediante el método de siembra por estría. Se observaron las colonias al microscopio (40x) y se comparó la morfología observada con la literatura. Se seleccionó la colonia que presentaba las características morfológicas reportadas en la literatura de *S. cerevisiae*, para posteriormente sembrar en medio YPD líquido almacenándolas en congelación (-80°C) con 30% de glicerol como crioprotector, para su conservación y utilización durante todo el proyecto.

7.2 Preparación de los medios de cultivo

7.2.1 Medio de cultivo sintético

El medio de cultivo sintético tenía la siguiente composición: 9.5% p/v de fructosa, 0.5% p/v de glucosa, 0.33% p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22% p/v de K_2HPO_4 (Segura-García *et al.*, 2014). Como fuente de nitrógeno se agregó una concentración de 100 y 300 ppm de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ y 100 ppm de aminoácidos (valina, leucina, isoleucina). Las fuentes de carbono y nitrógeno, así como las sales minerales, se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos por separado para posteriormente mezclarlos y añadir agua destilada estéril. Los aminoácidos se esterilizaron por microfiltración empleando filtros de jeringa Millex® de Merck Millipore® con un tamaño de poro de 0.22µm.

7.2.2 Mosto de *Agave angustifolia*

Se realizó una hidrólisis de la inulina presente mediante la cocción de las piñas de la especie *Agave angustifolia* recolectadas previamente en el estado de Oaxaca. Se cortaron las piñas en pedazos lo más pequeño posible, para después colocar 1 kg de piña en un matraz al que se le agregaron 2 L de agua destilada y H₂SO₄ al 0.01%. Posteriormente se calentó en una autoclave a 105°C durante 6 horas, concluido el tiempo de cocción, se procedió a la extracción del mosto y separación de los residuos de bagazo. Se empleó un extractor de jugos (Tur Mix) para obtener el jugo. La concentración de sólidos totales se determinó midiendo los grados °Brix, utilizando un refractómetro (Atago, Brix 0.0-33.0%). Con base en esto, los mostos fueron diluidos o concentrados para ajustarse a 10°Brix. Como fuente de nitrógeno se agregó una concentración de 100 y 200 ppm de (NH₄)₂PO₄ y 100 ppm de aminoácidos (valina, leucina, isoleucina). El mosto obtenido y la fuente de nitrógeno (fosfato diamónico) se esterilizaron por separado a 121°C durante 15 minutos. Los aminoácidos se esterilizaron por microfiltración empleando filtros de jeringa Milex® de Merck Millipore® con un tamaño de poro de 0.22µm.

7.3 Preparación de inóculo

La concentración celular fue determinada mediante un conteo de células en cámara de Neubauer (Boceco, Deep 1/10 mm). El objetivo de este conteo fue inocular un número de levaduras conocido (10⁹ cel/mL), para que al diluir el inóculo en el medio se obtuviera un orden de 10⁷ cel/mL. Se tomó 1 mL de cultivo en tubos Eppendorf estériles y se centrifugaron a 14000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado adicionando 1 mL de agua destilada estéril y centrifugado bajo las condiciones mencionadas anteriormente, esta operación se realizó tres veces con el fin de eliminar residuos del medio YPD. Una vez concluido este procedimiento, se inocularon los pellets celulares contenidos en cada tubo Eppendorf con una concentración de orden de 10⁷ cel/mL.

7.4 Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo en medio sintético y en mosto de *Agave angustifolia*. Se evaluaron cuatro condiciones con respecto a la cantidad de nitrógeno en el medio y el mosto. Las fermentaciones del Lote 1 se llevaron a cabo en tubos con capacidad de 400 mL con un volumen de 250 mL de medio y mosto respectivamente (relación 5:8); mientras que las del Lote 2 se realizaron en matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL con un volumen de 78 mL de medio y mosto respectivamente para guardar la misma relación. Las fermentaciones se realizaron en dos lotes de cada medio, en el primero se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno inorgánica, mientras que en el segundo se utilizaron aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) como fuente orgánica. En el primer lote, se presentaron dos condiciones para cada medio: una sin añadir nitrógeno y la otra con nitrógeno. En el segundo lote se presentaron cuatro condiciones: a) sin adición de nitrógeno, b) con valina, c) con leucina, d) con isoleucina.

En el primer lote, la condición con nitrógeno consistió en añadir al tubo con medio sintético una concentración de 300 ppm de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ y al mosto de agave 200 ppm de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$. En cuanto al segundo lote, se añadió la misma concentración de nitrógeno al medio sintético y al mosto de agave. La concentración presente durante la fermentación fue de 100 ppm de cada aminoácido por separado (valina, leucina, isoleucina). Cada una de las condiciones de fermentación se realizó por duplicado. Es importante resaltar que se debe considerar el nitrógeno presente en el mosto de agave, por lo que se realizó la determinación de nitrógeno y se obtuvo una concentración de 100 ppm. Para tener la misma cantidad de nitrógeno en las cuatro condiciones en cada medio, una condición del mosto consistió en no añadir nitrógeno para que todas las fermentaciones tuvieran 200 ppm de nitrógeno; mientras que, para el medio sintético, la primera condición consistió en añadir 100 ppm de fosfato diamónico para que todas las fermentaciones tuvieran 100 ppm de nitrógeno (Figura 10).

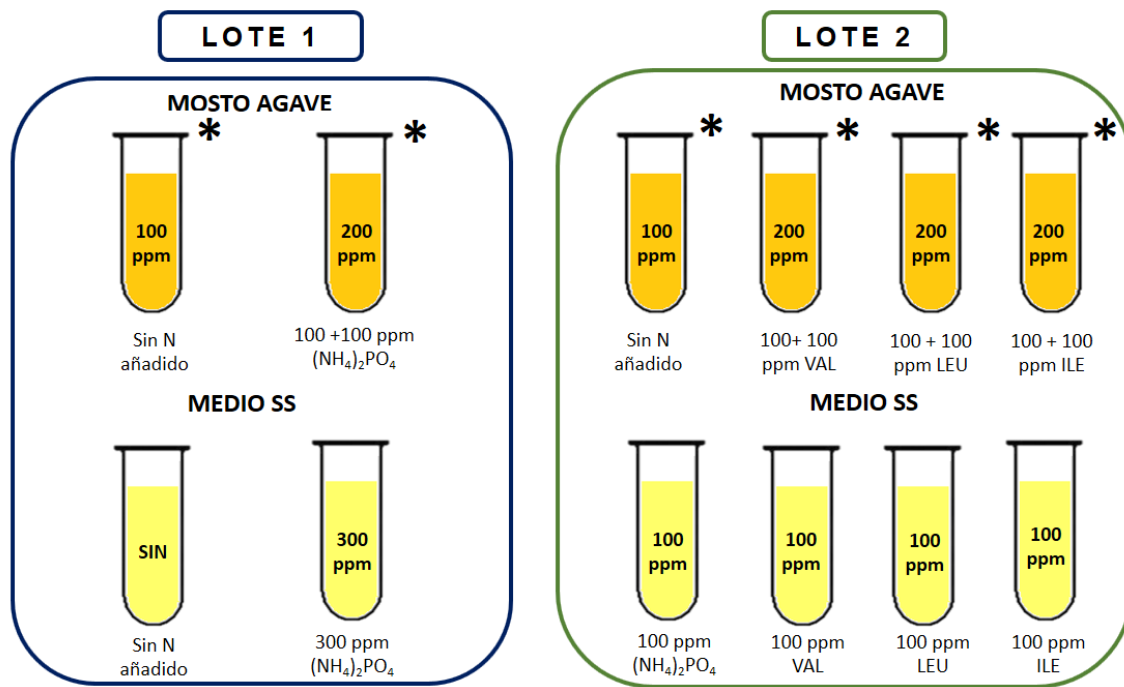


Figura 10. Representación de las 12 condiciones de fermentación llevadas a cabo con diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno. (*) Todos los tubos con mosto de agave contienen per se 100 ppm de nitrógeno.

Las fermentaciones del Lote 1 se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18-22°C) durante 9 días en el caso del medio sintético y durante 7 días en el mosto de agave. Las fermentaciones del Lote 2 se llevaron a cabo en una incubadora con temperatura constante (30°C) y agitación durante 6 días en el caso del medio sintético y durante 7 días en el mosto de agave.

7.5 Muestreo y monitoreo de las fermentaciones

Todas las muestras fueron tomadas al final de las fermentaciones, tomando duplicados de cada tubo para determinar °Brix, pH y conteo celular. Las muestras se conservaron en congelación (-18°C) para su posterior análisis de azúcares, etanol y alcoholes superiores. También se realizó un monitoreo del cambio de peso en todas las fermentaciones cada 24 horas.

7.6 Medición de biomasa

La cantidad total de biomasa presente se determinó por conteo celular en cámara de Neubauer. Se tomaron 100 µL de cada muestra para colocarlos en un tubo Eppendorf y diluirlos con 900 µL de agua destilada estéril y teñirlos con cristal violeta. Las diluciones se colocaron con una micropipeta de 100 µL en la cámara de Neubauer para realizar el conteo. Se observó mediante un microscopio Zeiss-Axio empleando un objetivo de 40X y un lente de 10X/20. Se contaron las células observadas dentro de cinco cuadros grandes elegidos al azar para posteriormente calcular la cantidad de células mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{No.de células}}{\text{mL}} = \frac{(\text{No.de células contadas})(\text{Dilución})}{(\text{No.de cuadros contados})(0.04*0.01)}$$

Los valores 0.04 y 0.1 corresponden al área y la profundidad de cada cuadro respectivamente.

7.7 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Los sólidos solubles totales se determinaron empleando un refractómetro (Atago, °Brix 0.0-33.0%).

7.8 Determinación de pH

La determinación de pH se realizó con tiras indicadoras de pH (Merck). La tira indicadora de pH se puso en contacto con la muestra hasta humedecer ligeramente y se comparó el color del papel con los colores estándares indicados por Merck.

7.9 Determinación de fructosa por HPLC

Las muestras se analizaron en términos de las concentraciones de fructosa presente en el medio. Las muestras se sometieron a un proceso de microfiltración empleando filtros de jeringa Millex® de Merck Millipore® con un tamaño de poro de 0.22µm para eliminar las sustancias que pudieran interferir en las determinaciones, como sales.

Los análisis se realizaron empleando cromatógrafo de líquidos Waters® 1525 equipado con un detector de índice de refracción Waters® 2414 y una columna Aminex® HPX-87, 300 mm x 7.8 mm con una temperatura del horno de 40°C. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0.05 N, con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. El tiempo de corrida fue de 15 minutos. La concentración de fructosa se determinó por el método de estándar externo, a partir de curvas de calibración. Se manejaron concentraciones de 0 a 10% v/v con intervalos de 2% (Anexo 1).

7.10 Determinación de etanol y alcoholes superiores por cromatografía de gases

Para estas determinaciones, las muestras también se sometieron a un proceso de microfiltración empleando filtros de jeringa Millex® de Merck Millipore® con un tamaño de poro de 0.22µm para eliminar las sustancias que pudieran interferir en las determinaciones, como sales.

Los alcoholes superiores y el etanol se determinaron empleando un cromatógrafo de gases Alignet® 6890N provisto con un detector de ionización (FID) y una columna empacada Optima Wax® de 60 m x 0.25 mm. Previo a las inyecciones, se realizó una rampa de calentamiento la cual consistió en calentar el horno a 40°C por 5 minutos con incrementos de 5°C/min hasta alcanzar una temperatura de 140°C y posteriormente de 10°C/min hasta alcanzar 240°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C. Los flujos de los gases fueron: H₂ a 40 mL/min, aire a 400 mL/min y N₂ a 28.3 mL/min. El tiempo de corrida fue de 45 minutos.

Para la determinación de los principales compuestos se utilizaron estándares de Sigma-Aldrich®: etanol 99%, n-propanol 99.8%, 2-metil-1-propanol 99.5%, 2-metil-1-butanol 99% y 3-metil-1-butanol 99%.

La curva de calibración se realizó con el método de estándar externo. En el caso de los alcoholes superiores, se manejaron concentraciones de 0 a 100 ppm con intervalos de 20 ppm, mientras que, para el etanol, las concentraciones fueron de 0 a 10%v/v con intervalos de 2% (Anexo 2).

7.11 Determinación de nitrógeno

Se empleó el método de Sörensen, el cual consiste en la valoración de la muestra con formaldehído empleando hidróxido de sodio como titulante. Con este método puede cuantificarse el nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN, por sus siglas en inglés), el cual comprende al amonio y a los restos de aminoácidos presentes en la muestra.

La ecuación empleada para esta determinación varía dependiendo de la concentración del hidróxido de sodio y el volumen de la alícuota empleada para la valoración. En términos generales, la ecuación puede quedar de la siguiente forma:

$$YAN \left(\frac{\text{mg N}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{mL gastados de NaOH}) \times \left(\frac{0.10 \text{ meq OH}^-}{\text{mL}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ meq N}}{1 \text{ meq OH}^-} \right) \times \left(\frac{14 \text{ mg}}{\text{meq N}} \right) \times \left(\frac{1000 \text{ mL}}{\text{L}} \right)}{(\text{mL muestra empleados}) \times (\text{factor de dilución})}$$

Nota: Si se emplea una concentración diferente de base (NaOH), la ecuación requiere un ajuste. Usualmente se emplea NaOH 0.1 N

7.12 Rendimientos

Para las fermentaciones se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$) y rendimiento de etanol experimental con respecto al teórico (Anexo 3).

7.13 Análisis Estadístico

Las determinaciones de los diferentes compuestos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron por medio del software **StatAdvisor**®. Los datos obtenidos se sometieron a la prueba LSD de Fisher (Least Significant Difference) para determinar si existe diferencias significativas entre cada tratamiento ($p \leq 0.005$) (Anexo 4).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder contrastar las características del medio después de la fermentación con las características iniciales, se realizaron diversas determinaciones para caracterizar el mosto de *A. angustifolia*. En el caso del medio sintético, al ser un medio preparado en el laboratorio, los valores estaban predeterminados, por lo que no fue necesario realizar determinaciones. Es importante destacar que ambos medios contenían fructosa como fuente principal de carbono y una mínima cantidad de glucosa.

El nitrógeno asimilable por la levadura (YAN por sus siglas en inglés) está compuesto por la suma de dos fuentes de nitrógeno: el nitrógeno amoniacal (NH_4^+); y el nitrógeno total, que incluye los alfa aminoácidos (a excepción de la prolina debido a que no es asimilable en anaerobiosis). El mosto de agave contiene per se cierta cantidad de nitrógeno que, de acuerdo con Leal *et al.* (2003), comprende una cantidad mayor de nitrógeno total en comparación con el contenido de nitrógeno amoniacal (Tabla 2).

Tabla 2. Composición del medio sintético y del mosto de *A. angustifolia*.

Medio	Fructosa (%)	Glucosa (%)	Nitrógeno (mg/L o ppm)
Sintético	9.5	0.5	NA
Mosto	10.33 ± 0.21	3.37 ± 0.02	99.5 ± 0.97

NA: No Aplica (la formulación del medio sintético no contiene fuente de nitrógeno. Se añade después de acuerdo con la condición).

Para poder realizar la cuantificación de los alcoholes superiores, el etanol y los cálculos de los rendimientos, se realizaron curvas de calibración (Anexo 1 y 2). En el caso de la fructosa (cuantificada por HPLC), se obtuvo un tiempo de retención de 12.35 ± 0.02 minutos. En cuanto a los alcoholes cuantificados por cromatografía de gases, los tiempos de retención fueron: a) etanol 7.22 ± 0.03 min, b) propanol 10.20 ± 0.01 min, c) isobutanol 12.21 ± 0.02 min, d) alcohol amílico 15.95 ± 0.01 min y alcohol isoamílico 16.01 ± 0.01 min.

8.1 Producción de CO₂ y crecimiento celular

Considerando que durante la fermentación se consumen los azúcares del medio y se producen etanol y CO₂, se puede inferir que la pérdida de peso es consecuencia de la generación de CO₂ liberado. Es por eso que, la fermentación se da por terminada cuando el peso se mantiene constante (Fernández *et al.*, 2012).

En estudios previos, la adición de nitrógeno en fermentaciones se ha desarrollado con diferentes tipos de azúcar. Estos estudios indican que, si se adiciona una cantidad adecuada de nitrógeno, el tiempo de fermentación puede reducirse al incrementar el transporte de azúcares (Salmon *et al.*, 1993). Con un parámetro como la pérdida de peso es posible observar la diferencia en la velocidad de fermentación, evidenciando el efecto de la adición de nitrógeno. Por ello, a lo largo de las fermentaciones, el peso de los tubos fue monitoreado, las Figuras 11 y 12 muestran el transcurso de la fermentación de los diferentes tratamientos realizados en medio sintético y mosto.

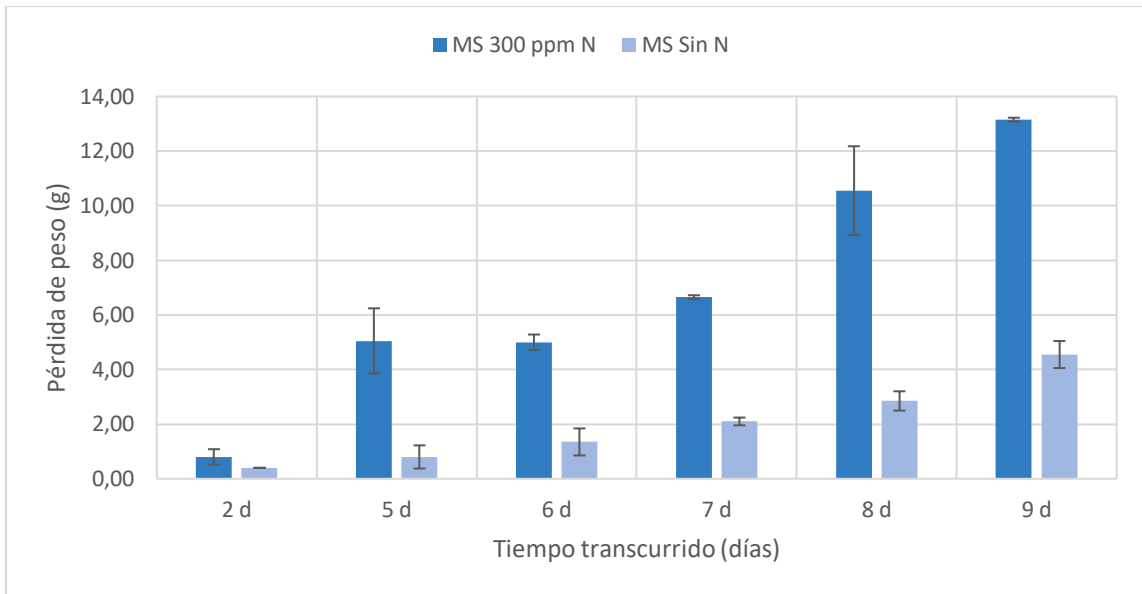
La Figura 11 muestra los tratamientos realizados con el Lote 1, en el cual se utilizó (NH₄)₂PO₄ como fuente adicionada de nitrógeno. En la figura 11a, se observa una marcada diferencia en el medio sintético, observándose en el que contenía un exceso de nitrógeno (300 ppm) perdió peso en menor tiempo que aquel que no tenía nitrógeno. Esto indica que la adición de nitrógeno activó la fermentación, finalizando antes la fermentación que contenía nitrógeno. La fermentación carente de nitrógeno muestra una pérdida de peso casi lineal durante toda la fermentación, característica que presentan las curvas de fermentación con limitante de algún nutriente.

A pesar de no ser tan marcado en el mosto, en la Figura 11b se muestra el mismo comportamiento. Al comparar los resultados de las fermentaciones en medio sintético con las realizadas en mosto de *Agave angustifolia*, se observa que la pérdida de peso en el mosto resulta casi la quinta parte de la pérdida que se dio en el medio sintético. Esto puede deberse a que respecto a la condición en la que se añadió nitrógeno, el mosto contenía una menor cantidad (200 ppm) que el medio sintético (300 ppm). Esto aunado a que la fuente de nitrógeno en el medio sintético provenía únicamente de iones amonio (NH_4^+) (300 ppm), mientras que en el mosto sólo la mitad de la fuente era de este carácter (sólo 100 ppm) y las levaduras asimilan más fácilmente esta fuente de nitrógeno.

Durante la fermentación la levadura toma el nitrógeno de los aminoácidos, perdiendo su carácter anfótero y pasando a ácidos, lo cual origina una disminución del pH del medio. Estudios reportan que el pH más favorable para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra entre 4.4-5.0, con un pH de 4.5 para su crecimiento óptimo (Vargas *et al*, 2010). La poca pérdida de peso en las fermentaciones llevadas a cabo en el mosto en comparación con el medio sintético (Lote 1) se puede atribuir a que durante la hidrólisis de inulina presente en la piña de agave se agregó un exceso de ácido (con un pH de 2.5), por lo que el mosto presentaba una acidez muy alta, saliendo del intervalo de pH óptimo. Esto derivó en un alargamiento de la fase exponencial para que las levaduras se adaptaran a esta condición de estrés, impidiendo a la levadura fermentar durante ese tiempo. Es por eso que, en procesos industriales, se usan soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Ríos, *et al* 2005).

En cuanto al Lote 2, en el medio sintético (Figura 12a) se observa que la fermentación que contenía $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ perdió peso en menor tiempo en comparación con las fermentaciones que contenían los aminoácidos. Esto se debe a que el nitrógeno amoniacal (NH_4^+) es preferido por las levaduras, ya que es muy fácilmente asimilable, siendo así la fuente principal de nitrógeno en fermentaciones alcohólicas. A diferencia de esto, los aminoácidos, al ser adicionados en la primera etapa de la fermentación, son almacenados y se utilizan en etapas posteriores para la síntesis proteica, cuando hay escasez de iones amonio (Leal *et al.*, 2003; Fermentis, 2010).

a)



b)

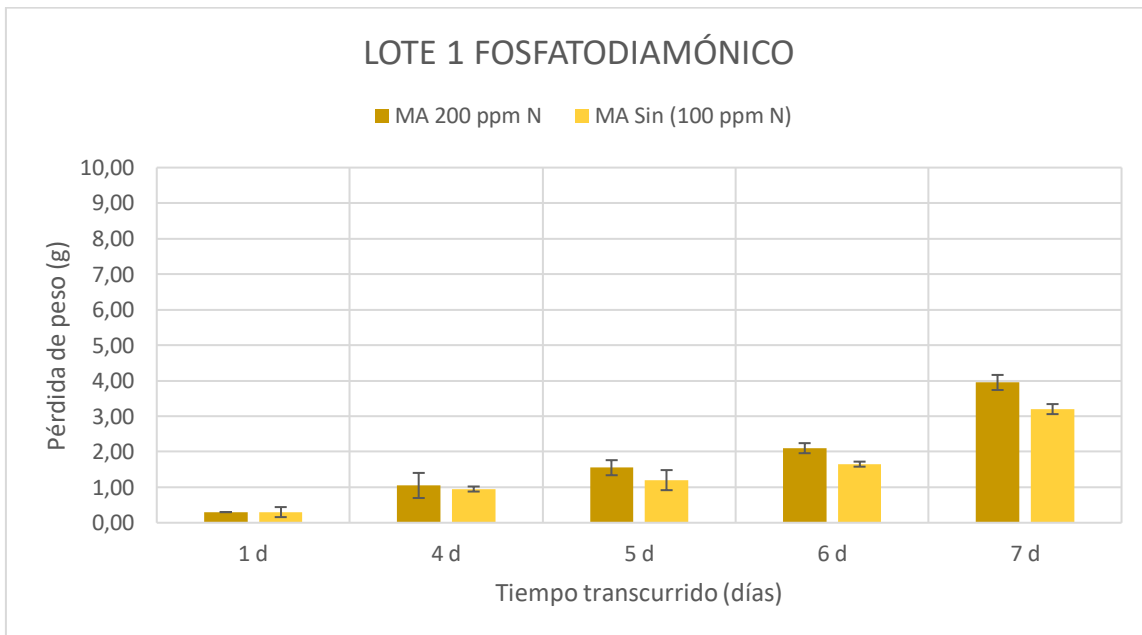
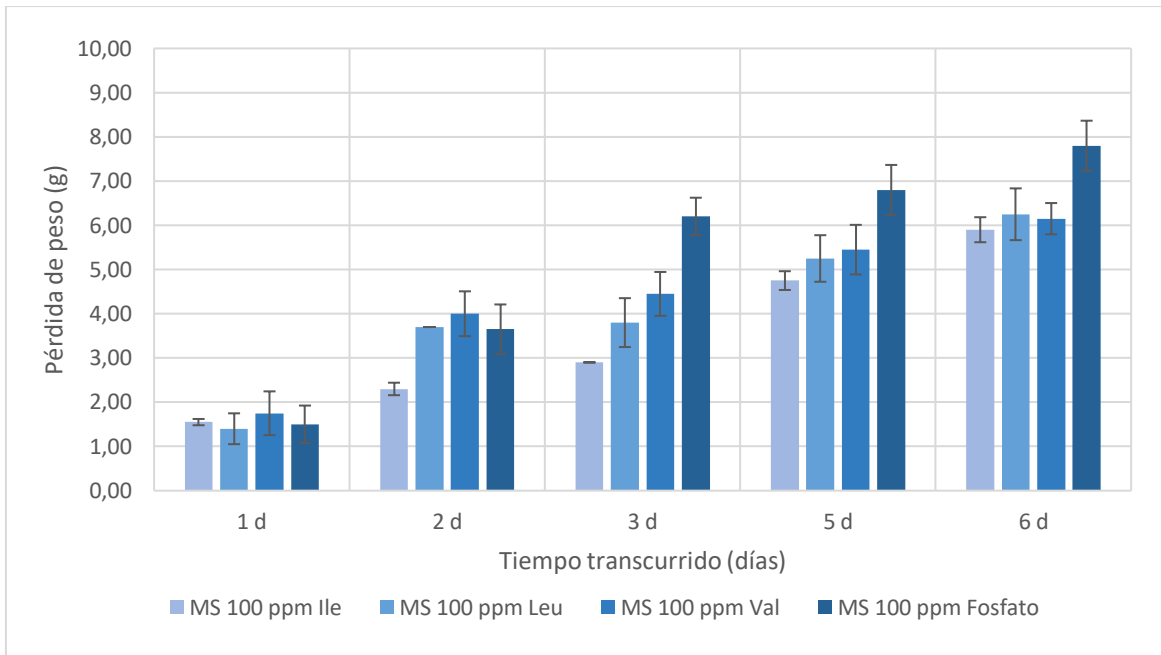


Figura 11. Pérdida de peso durante la fermentación del Lote 1 con y sin $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno inorgánica en (a) medio sintético y (b) mosto de *A. angustifolia*. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

a)



b)

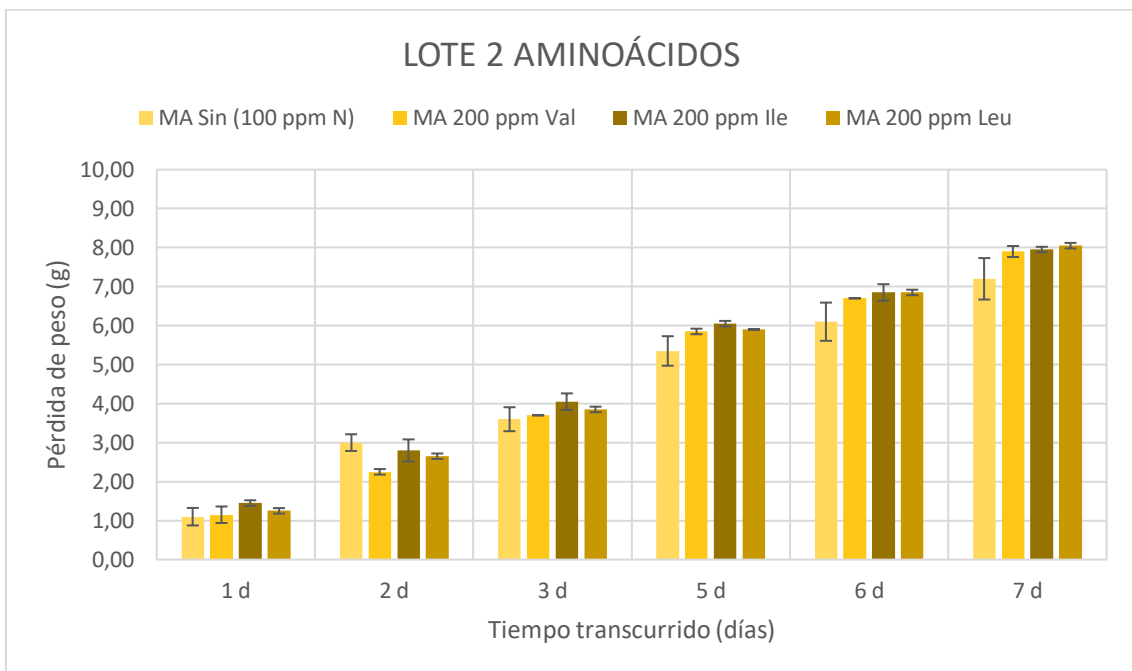
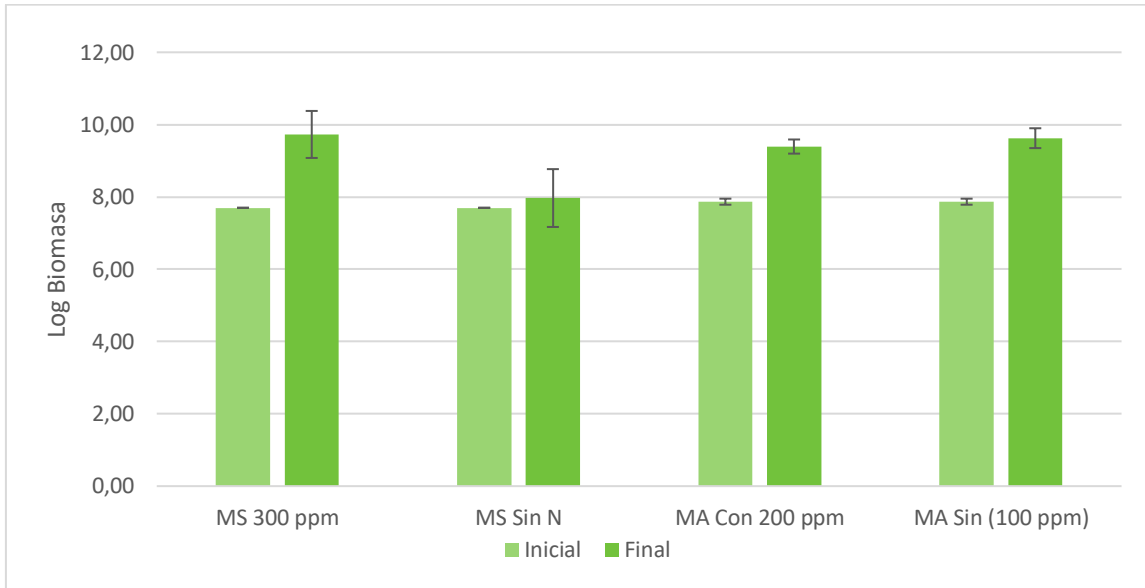


Figura 12. Pérdida de peso durante la fermentación del Lote 2 en (a) medio sintético con aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) y $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno y (b) mosto de *A. angustifolia* con aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) como fuente de nitrógeno. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

En la Figura 13a se muestra el crecimiento de las levaduras durante las fermentaciones del Lote 1, observándose que el tratamiento de medio sintético que contenía nitrógeno alcanzó un crecimiento superior al que carecían de este nutriente. Se ha demostrado que el exceso de iones amonio genera aumento de la biomasa, que incrementa a su vez la demanda de nitrógeno (Fermentis, 2010). De acuerdo con esto, en el medio sintético, al tener un exceso de iones amonio (300 ppm) la biomasa aumentó significativamente a comparación del tratamiento carente de nitrógeno; mientras que, en el mosto, al contar sólo con 100 ppm de iones amonio, se desarrolló una cantidad de biomasa casi igual en los dos tratamientos.

En la Figura 13b se observa que, en el medio sintético, el tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ tuvo un mayor crecimiento en comparación con los tratamientos adicionados con aminoácidos y con todos los tratamientos de mosto de *A. angustifolia*. Esto conduce a pensar que ante un exceso de iones amonio, la levadura prefiere estos como fuente de nitrógeno casi en forma exclusiva. Sin embargo, comparando los tratamientos que contenían aminoácidos entre sí, no se es evidente alguna diferencia. También se puede observar que, en el mosto, el tratamiento que carece de fuente de nitrógeno desarrolló una biomasa menor a la de cualquiera de los tratamientos adicionados con aminoácidos. Se ha observado que el aumento de biomasa es proporcional al aumento de concentración de nitrógeno hasta llegar a una concentración a partir de la cual ya no aumenta esta biomasa; es decir sería la concentración mínima de nitrógeno para obtener la biomasa máxima (*Nitrogen Reference Value*, NRV). Esto se confirma al observar los datos obtenidos durante este experimento.

a)



b)

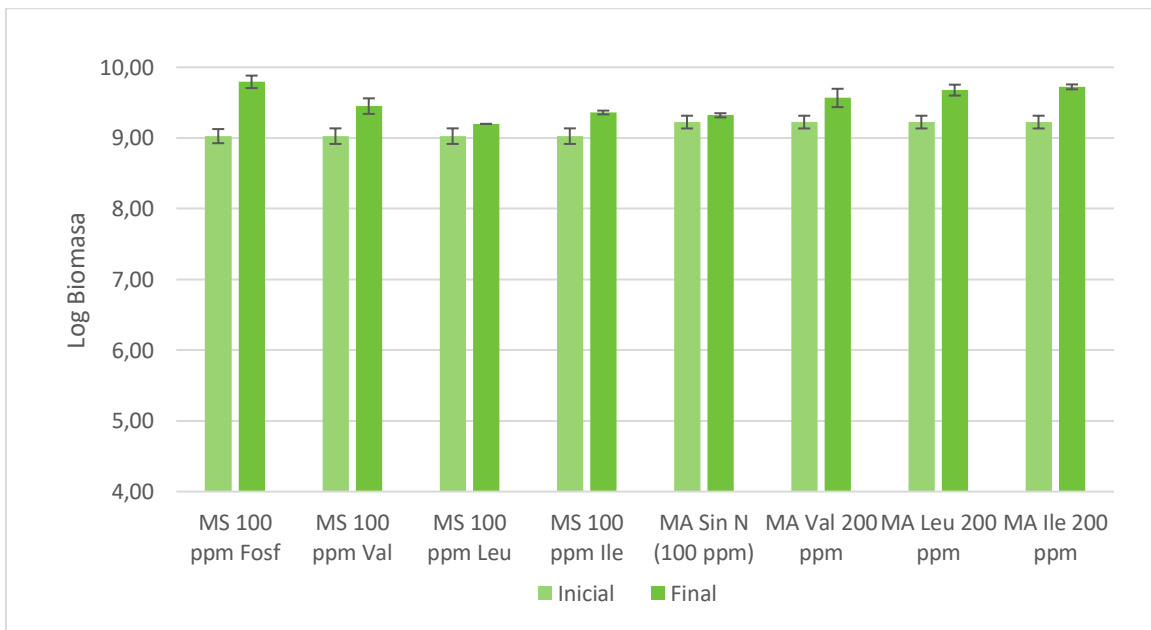


Figura 13. Comparación de la concentración celular antes y después de la fermentación de (a) Lote 1 con $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno inorgánica y (b) Lote 2 con aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) como fuente de nitrógeno orgánica. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

8.2 Consumo de fructosa

La Tabla 3 muestra los parámetros calculados de: porcentaje de consumo de sustrato, rendimiento de etanol con respecto al sustrato ($Y_{p/s}$) y rendimiento de etanol obtenido experimentalmente con respecto al calculado teóricamente.

Tabla 3. Porcentajes de consumo de fructosa, $Y_{p/s}$ y rendimiento de etanol en las fermentaciones.

	Medio	Tratamiento	Consumo de fructosa (%)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Rendimiento (%)
LOTE 1	Sintético	SN	84,15	0,20	32,71
		300 $-(NH_4)_2PO_4$	80,47	0,24	37,33
	Mosto	SN- 100	81,51 ^A	0,06 ^A	8,95 ^A
		200 $-(NH_4)_2PO_4$	88,29 ^a	0,08 ^a	17,10 ^a
LOTE 2	Sintético	100 $-(NH_4)_2PO_4$	95,40 ^B	0,35 ^B	65,65 ^B
		100 - Val	94,57 ^C	0,39 ^C	72,90 ^C
		100 - Leu	95,00 ^C	0,25 ^D	46,54 ^D
		100 - Ile	94,77 ^C	0,35 ^B	64,90 ^B
	Mosto	SN- 100	86,63 ^D	0,16 ^E	27,15 ^E
		200 - Val	86,62 ^b	0,14 ^b	23,65 ^b
		200 - Leu	87,06 ^{ab}	0,12 ^c	20,26 ^c
		200 - Ile	92,60 ^d	0,10 ^a	18,59 ^d

En donde SN indica que los tratamientos no tenían nitrógeno añadido y los números indican la concentración de nitrógeno en ppm. (El mosto cuenta, per se con 100 ppm de nitrógeno YAN) $Y_{p/s}$ se refiere al rendimiento de etanol (producto) con respecto al sustrato (fructosa) y el rendimiento de etanol proviene de la relación de la cantidad de etanol obtenida con respecto a la cantidad teórica calculada. Los valores acompañados con la misma letra superíndice significa que no hay diferencia significativa (LSD de Fisher $p \leq 0.005$).

El parámetro de consumo de azúcar nos indica qué cantidad de azúcar fue utilizada durante la fermentación como fuente de sustrato de las levaduras para ser transformada en etanol. Durante el cocimiento, si la temperatura es alta, los azúcares producidos tienden a caramelizarse y formar compuestos de Maillard (enoles, furfurales, anhídridos difructosídicos e hidroximetilfurfurales); esto representa una gran pérdida de azúcares reductores y compuestos nitrogenados disponibles. Esto conlleva a la reducción de rendimiento del proceso y puede afectar la eficiencia de fermentación (Allier y González, 1999; Mancilla y López, 2002). En la Tabla 3 se observa que, en los dos lotes, la fructosa tuvo un mayor consumo en el medio sintético; esto puede deberse a que la hidrólisis de inulina en el agave no fue efectiva.

El mayor consumo de fructosa lo obtuvo el tratamiento de fosfato de amonio en el medio sintético (95.40%), reafirmando que la adición de sales de amonio acelera el metabolismo de la levadura, por lo que esta puede asimilar con mayor rapidez los azúcares para poder biotransformarlos en etanol (Jacques *et al.*, 2003).

Además, se ha comprobado que la adición de sales de amonio resulta más efectiva para la activación del transporte de los azúcares debido a la inducción de la biosíntesis de las proteínas encargadas del transporte de azúcares (Salmon, 1989; Mauricio y Salmon, 1992; Salmon *et al.*, 1993) y la reducción del tiempo de fermentación (Mendes-Ferreira *et al.*, 2004; Beltran *et al.* 2005).

8.3 Rendimiento y producción de etanol

El menor rendimiento se observó en el mosto sin nitrógeno del Lote 1, lo cual conlleva a pensar que el pH tuvo influencia también en la cantidad de etanol generada, como ya antes se había mencionado. A pesar de esto, es evidente que el rendimiento aumenta en los tratamientos que contenían nitrógeno en su formulación, tanto en el mosto como en el medio sintético (Tabla 3).

Con respecto al rendimiento de etanol, en el Lote 2, la mayor cantidad se obtuvo en el medio sintético adicionado con valina ($Y_{p/s} = 0.39$). Esto puede significar que este aminoácido resulta recomendable en este medio si lo que se busca es obtener una mayor cantidad de etanol. La pobreza del medio en nitrógeno amoniacal, hace aumentar la formación de los alcoholes superiores, por tener que proveerse las levaduras de nitrógeno a partir del nitrógeno amoniacal obtenido mediante la desaminación de los aminoácidos presentes en el mismo (Walker, 1999; Ter Schure *et al.*, 1998). Al observar los resultados obtenidos en mosto, el mayor rendimiento se obtuvo en la fermentación que no contenía nitrógeno ($Y_{p/s} = 0.16$), lo cual conlleva a pensar que, en los tratamientos adicionados con aminoácidos, el metabolismo de la levadura se centró en la producción de alcoholes superiores más que en la producción de etanol.

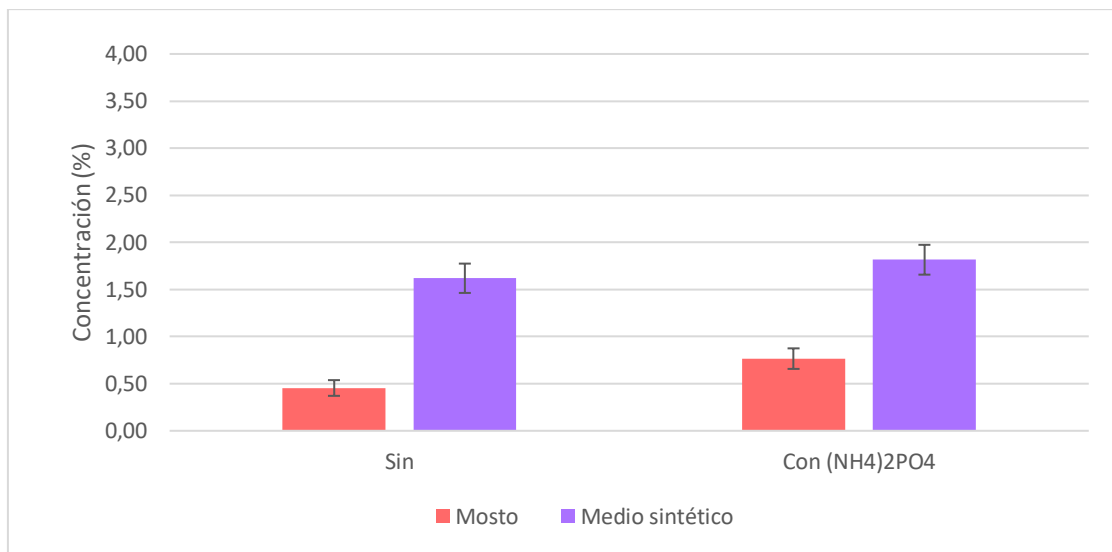
Es importante destacar que, a pesar de que el mosto adicionado con isoleucina tuvo un porcentaje de consumo de fructosa alto (92.60%), su rendimiento de etanol con respecto al sustrato fue bajo (0.10). Probablemente esta cepa utilizó el sustrato para el crecimiento celular, es decir, empleó el sustrato como mecanismo de producción de biomasa y no de metabolitos. Esto se reafirma con el crecimiento celular obtenido para este tratamiento (Figura 13b).

Para hacer frente a situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. La prioridad de la levadura deja de ser fermentar para producir alcohol y pasa a sintetizar compuestos que la ayuden a sobrevivir (Folch *et al.*, 2004). Aquellos tubos que no contaban con nitrógeno añadido, produjeron una menor cantidad de etanol (Figura 14a). Esto puede deberse a que las células que se encontraban en el medio con falta de fuente de nitrógeno estaban en un estado de estrés, lo cual no les permitía fermentar muy rápido la cantidad de azúcar presente para convertirla en etanol.

La mayoría de los tratamientos tuvieron mayor producción de etanol en medio de cultivo sintético que en mosto de agave. Al utilizar un medio de cultivo sintético es posible dirigir la fermentación alcohólica para favorecer la producción de etanol debido a que se puede controlar la formulación del medio. En cambio, en el mosto es necesario que durante el cocimiento la inulina se hidrolice ya que, si no es hidrolizada, no podrá ser utilizada por la levadura para producir etanol durante la fermentación (Allier y González, 1999). Es posible que la hidrólisis de la inulina no haya sido efectiva.

Los tratamientos del Lote 2 presentan una menor cantidad de etanol producida. La razón de esta diferencia es la temperatura. De acuerdo con García *et al.* (1993), a una temperatura de 25°C, las cepas de *S. cerevisiae* dominan la fermentación y las otras especies mueren, mientras que a 20°C algunas especies no pertenecientes a *Saccharomyces* sobreviven. Al provenir el inóculo de una cepa de *S. cerevisiae*, siendo esta especie la productora de etanol por excelencia en las fermentaciones alcohólicas, a una temperatura más baja (Lote 1), se producirá una menor cantidad de etanol.

a)



b)

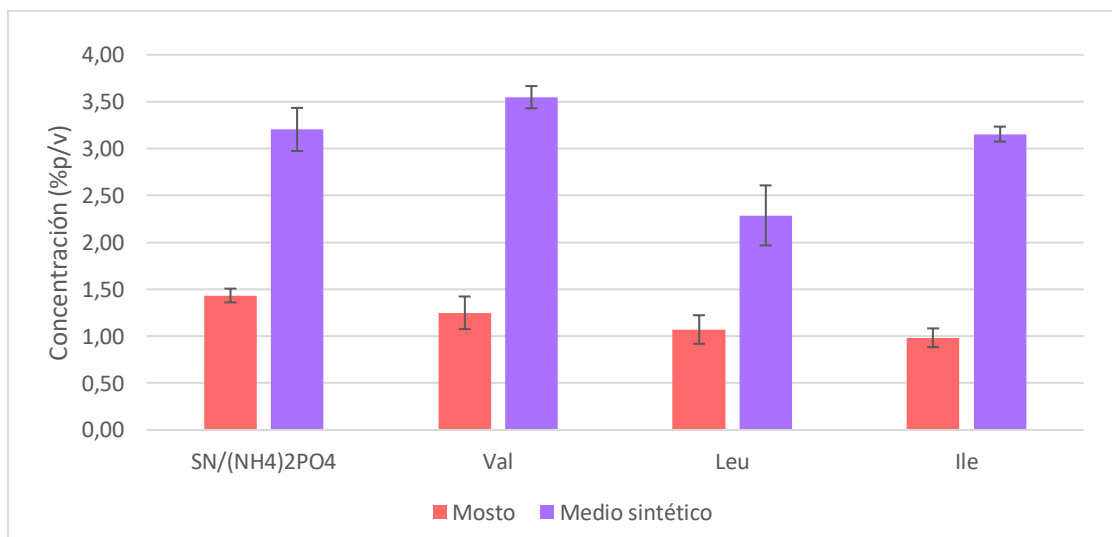


Figura 14. Concentración de etanol producido durante la fermentación en (a) Lote 1 con $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno inorgánica y (b) Lote 2 con aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) como fuente de nitrógeno orgánica. Las barras representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos.

Tabla 4. Concentración de los alcoholes superiores presentes en medio sintético y mosto de *A. angustifolia* el último día de fermentación.

	MEDIO	TRATAMIENTO	ETANOL (%V/V)	N-PROPANOL (PPM)	ISOBUTANOL (PPM)	ALCOHOL AMÍLICO (PPM)	ALCOHOL ISOAMÍLICO (PPM)
LOTE 1	Mosto	SN-100	0.45 ± 0.05 ^A	4.63 ± 0.20 ^A	2.43 ± 0.06 ^A	4.93 ± 0.38 ^A	ND
		200 -(NH ₄) ₂ PO ₄	0.90 ± 0.05 ^a	4.07 ± 0.06 ^a	1.17 ± 0.04 ^a	5.36 ± 0.49 ^a	ND
	Sintético	SN	1.59 ± 0.29	10.66 ± 0.46	5.39 ± 0.24	3.63 ± 0.41	2.45 ± 0.23
		300 -(NH ₄) ₂ PO ₄	1.82 ± 0.33	5.78 ± 0.43	34.85 ± 0.35	4.29 ± 0.38	4.29 ± 0.38
LOTE 2	Mosto	SN-100	1.43 ± 0.07 ^B	9.11 ± 0.01 ^B	10.97 ± 0.13 ^B	3.78 ± 0.24 ^B	8.19 ± 0.53 ^A
		200 - Val	1.25 ± 0.17 ^b	ND	18.22 ± 0.12 ^b	10.44 ± 0.05 ^b	ND
		200 - Leu	1.07 ± 0.15 ^{ab}	ND	ND	ND	32.58 ± 0.64 ^a
		200 - Ile	0.98 ± 0.02 ^{ab}	ND	ND	21.47 ± 0.59 ^c	ND
	Sintético	100 -(NH ₄) ₂ PO ₄	3.20 ± 0.19 ^C	15.72 ± 0.42 ^C	30.48 ± 0.76 ^C	12.67 ± 0.39 ^{BC}	24.85 ± 0.91 ^B
		100 - Val	3.55 ± 0.12 ^D	10.80 ± 0.46 ^D	120.32 ± 2.68 ^D	22.02 ± 0.43 ^D	45.43 ± 0.53 ^C
		100 - Leu	2.29 ± 0.18 ^E	9.02 ± 0.03 ^E	30.25 ± 0.78 ^E	11.54 ± 0.33 ^C	119.29 ± 1.31 ^D
		100 - Ile	3.15 ± 0.02 ^C	8.65 ± 0.09 ^E	48.64 ± 0.11 ^F	113.39 ± 1.08 ^F	41.44 ± 0.63 ^E

En donde SN indica que los tratamientos no tenían nitrógeno añadido y los números indican la concentración de nitrógeno en ppm y ND significa No Determinado debido a que el método no fue lo suficientemente sensible para detectar el compuesto. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de dos repeticiones de los tratamientos. Los valores acompañados con la misma letra superíndice significa que no hay diferencia significativa (LSD de Fisher $p \leq 0.005$).

8.4 Producción de alcoholes superiores

Los principales compuestos volátiles reportados durante la fermentación de *S. cerevisiae* en mosto de agave y medio sintético son los siguientes: alcoholes superiores (n-propanol, n-butanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico y 2-feniletanol); ésteres (acetato de etilo); aldehídos; metanol y etanol (Díaz *et al.*, 2008; De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Segura-García, 2014). En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de los alcoholes superiores (n-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol) y alcoholes amílicos (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol).

La fermentación en medio de cultivo sintético adicionado con 100 ppm de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ destacó por la producción de n-propanol en mayor concentración (15.72 ± 0.42). Esta fermentación también obtuvo la mezcla de alcoholes superiores más homogénea, lo que indica que, de acuerdo también con Leal *et al.* (2003), la mayoría de los iones amonio fueron utilizados para la biosíntesis de los cuatro alcoholes superiores cuantificados.

La formación de los isómeros del alcohol amílico (3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol) es a través de dos posibles rutas: por la desaminación de leucina e isoleucina (vía Ehrlich) o por los intermediarios en la biosíntesis de estos aminoácidos (Arellano, 2011). En el Lote 2, en los dos medios, se observa como al adicionar estos aminoácidos, se incrementa la concentración de los alcoholes amílicos; al adicionar leucina se incrementa la cantidad de alcohol isoamílico y al adicionar isoleucina se incrementa la cantidad de alcohol amílico. Lo mismo se observa en el caso de la valina y el isobutanol.

Arellano (2011) reportó que los intermediarios en la biosíntesis de los alcoholes amílicos puede ser la vía principal de la producción de alcohol amílico, ya que el jugo de agave no es rico en leucina e isoleucina. En este caso, la formación de estos compuestos ocurrió después del crecimiento de *S. cerevisiae*, cuando los aminoácidos eran activamente necesarios.

La diferencia en 3-metil-1-butanol puede ser debida a las diferencias en la relación C/N en los mostos. Estos resultados son similares a los de Pinal *et al.* (1997) y Arrizon y Gschedler (2006), quienes en tequila encontraron que una alta relación C/N produce mayor concentración de alcoholes superiores como resultado de las reacciones de desaminación de aminoácidos, y probablemente porque las cadenas de carbono favorecen la síntesis de alcoholes superiores (Walker, 1999; Delfini y Formica, 2001).

Las concentraciones de los alcoholes superiores desarrollados en todas las fermentaciones en este trabajo se compararon con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana del mezcal (NOM-070-SCFI-1994). La producción de alcoholes superiores de los dos lotes se encuentra debajo del intervalo permitido, el cual es de 100 a 400 mg/mL (Figura 15).

La concentración máxima del Lote 1 la tuvo el tratamiento de medio sintético con 300 ppm de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, obteniendo un total de 46.08 mg/100 mL, mientras que en el Lote 2 la tuvo el tratamiento de medio sintético con 100 ppm de isoleucina (212.11 mg/mL). Al no sobrepasar ninguno de los tratamientos el intervalo establecido por la norma, se observa que las fermentaciones con la levadura empleada y la fuente y cantidad de nitrógeno se ajustan a la norma. Sin embargo, es muy importante considerar que no se realizó la etapa de destilación que involucra la separación y concentración de alcoholes y otros compuestos volátiles, por lo tanto, no se puede concretar si este cumple con las especificaciones al no ser considerado un producto terminado.

Se ha observado que las transformaciones bioquímicas durante el proceso de fermentación alcohólica, ocurren durante las primeras 24 horas. La máxima cantidad de alcoholes superiores se produce en el estado inicial de fermentación (Otero *et al.*, 2006). Con esto se puede deducir que la cantidad de alcoholes superiores es independiente del tiempo que dure la fermentación. Esto se evidencia al observar que la cantidad de alcoholes superiores generada en el Lote 2 fue mucho mayor que en Lote 1, siendo que las fermentaciones en el Lote 1 duraron 7 y 9 días para mosto de agave y medio sintético respectivamente, mientras que en el Lote 2 fueron 7 y 6 días (Figura 15).

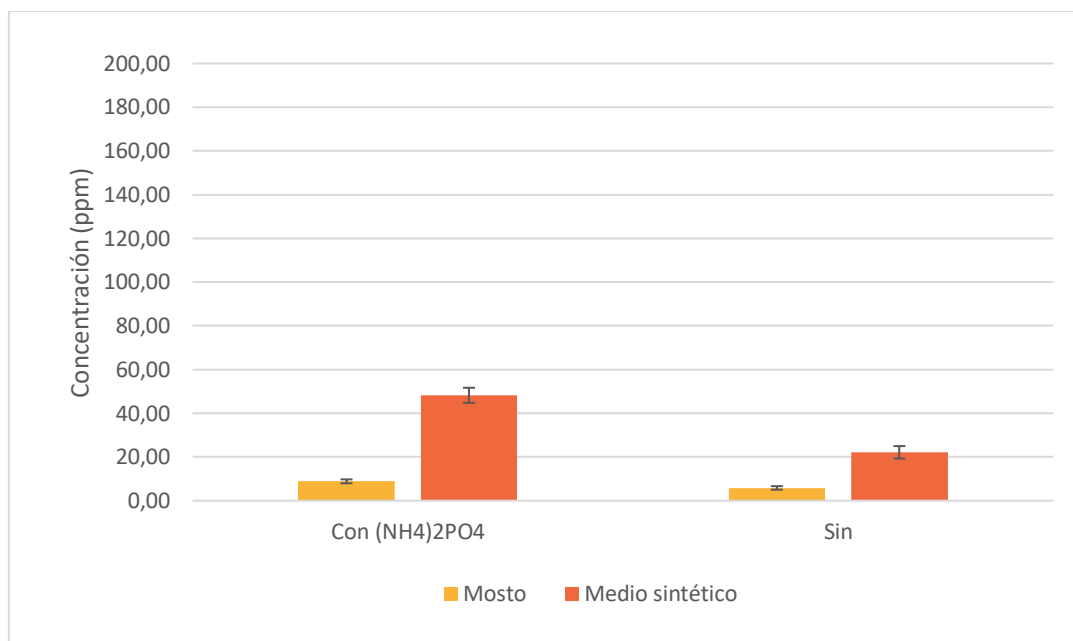
De acuerdo con la *ruta de Ehrlich*, los aminoácidos son desaminados en los correspondientes ácidos cetónicos y, posteriormente, estos son descarboxilados en aldehídos para finalmente transformarse en alcoholes superiores por reducción (Hidalgo, 2010). Comparando el Lote 1 con el Lote 2, se observa que la adición de aminoácidos a las fermentaciones, aumentan significativamente la cantidad de alcoholes superiores producidos.

Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la temperatura también pudo jugar un papel importante en esta diferencia. Cuando la fermentación sucede en presencia de temperaturas altas (por arriba de los 20°C en el caso de producción de bebidas alcohólicas) favorecen la producción de alcoholes superiores, esteres y ácidos grasos, mientras que temperaturas entre los 5°C y los 15°C favorecen particularmente la producción de acetaldehído y diacetilo (Téllez *et al.*, 2012). Tal como se describe anteriormente, al observar la Gráfica 15, se observa la diferencia entre el Lote 1 (18-22°C) y el Lote 2 (30°C).

La leucina, la isoleucina y la valina dan origen a los alcoholes isoamílico, amílico e isobutílico respectivamente. El n-propanol, a diferencia de los anteriores se forma a partir de un aminoácido polar no cargado: le treonina (Santillán *et al.*, 1998). En los resultados obtenidos en el Lote 2 en medio sintético, se observa que la mayor cantidad de isobutanol (120.32 ± 2.68 mg/L) se obtuvo al agregar valina, la mayor cantidad de alcohol isoamílico (119.29 ± 1.31 mg/L) se obtuvo al agregar leucina y la mayor cantidad de alcohol amílico (113.39 ± 1.08 mg/L) se obtuvo al agregar isoleucina. Lo que confirma la correlación entre los aminoácidos y los alcoholes superiores.

Los tratamientos tuvieron mayor producción de alcoholes superiores en medio de cultivo sintético que en mosto de agave. Al utilizar un medio de cultivo sintético es posible dirigir la fermentación alcohólica para favorecer la producción de etanol debido a que se puede controlar la formulación del medio. En cambio, en el mosto es necesario que durante el cocimiento la inulina se hidrolice ya que, si no es hidrolizada, no podrá ser utilizada por la levadura para producir etanol durante la fermentación (Allier y González, 1999).

a)



b)

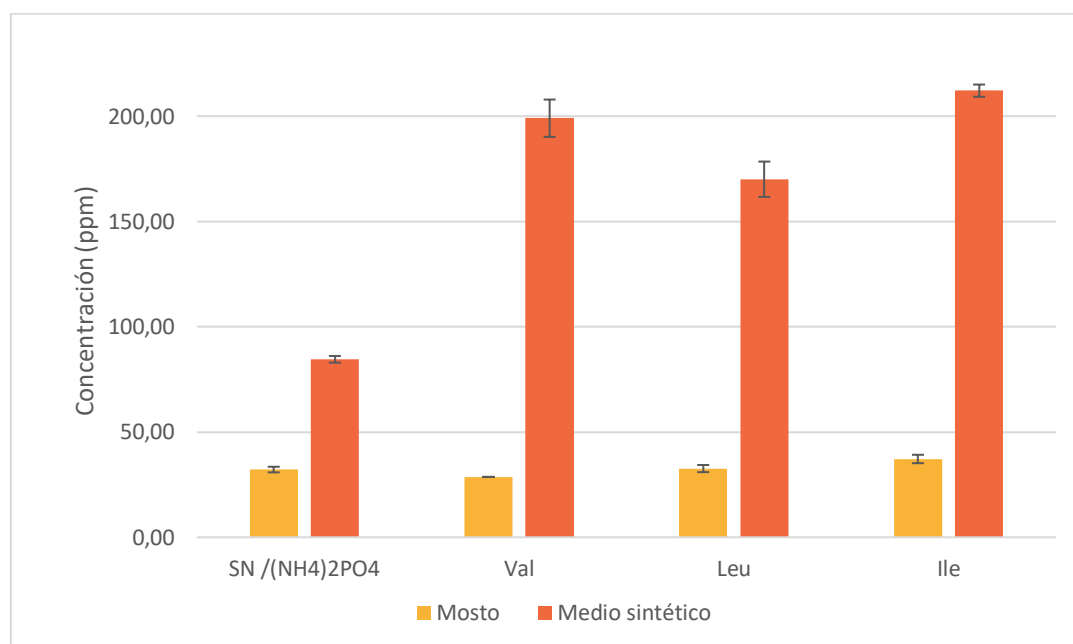


Figura 15. Suma de las concentraciones de los alcoholes superiores (n-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) obtenidas al final de la fermentación en (a) Lote 1 con (NH₄)₂PO₄ como fuente de nitrógeno inorgánica y (b) Lote 2 con aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) como fuente de nitrógeno orgánica.

9 CONCLUSIONES

- Durante las fermentaciones, la levadura, prefiere fuentes de nitrógeno orgánicas, como los aminoácidos, en comparación con los aminoácidos para la producción de etanol y alcoholes superiores.
- Dependiendo del aminoácido que se adicione a la fermentación, se tendrá un perfil de alcoholes superiores diferente. Al adicionar valina, leucina e isoleucina, los alcoholes superiores predominantes al final de la fermentación serán isobutanol, alcohol amílico y alcohol isoamílico respectivamente.
- La fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo en donde se lleve a cabo la fermentación tiene un impacto importante en el perfil metabólico de la cepa, lo que desencadena un cambio en la producción de alcoholes superiores.

10 PERSPECTIVAS

Profundizar en el estudio del efecto de la adición de las distintas fuentes de nitrógeno en mosto de agave y medio sintético sobre los alcoholes superiores generados. Probar diferentes mezclas de los diferentes aminoácidos, en los medios de cultivo para observar el efecto generado en los perfiles de alcoholes superiores.

Profundizar en el efecto de la levadura empleada en las fermentaciones en mosto de agave y medio sintético sobre los alcoholes superiores generados. Probar cepas de levaduras silvestres provenientes de agaves mezcaleros para observar el efecto generado en los perfiles de alcoholes superiores.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Albers, E., Larsson, C., Liden, 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.
- Allier, G.A. y González, B. O. (1999). Tesis profesional: Estudio del cocimiento del maguey Mezcalero. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca, México.
- Anaya, A.; Espinosa-García, F.; Cruz-Ortega, R. (2001). *Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. Ed. Plaza y Valdés. México. p. 186.
- Arellano, M.G. (2011). Major volatile compound analysis produced from mezcal fermentation using gas chromatography equipped headspace (GC-HS). *International Technology. Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications International Technology* 73-88.
- Arrizon J., Gschaedler A. (2006) Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology* 102:1123-1131.
- Arrizon, J.; 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. *Can. J. Microbiol.*48: 965-970.
- Astromoff, A. (2000). *Saccharomyces cerevisiae*: Genetics and Genomics. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Demain Arnold L. (ed), 2th edition, ASMP Press, pp 435-446.
- Barrera Gómez, J.; Hernández Vaca, V.; Leal Robles, A. (2012). Ruta mezcalera: un recorrido por su elaboración. *Culinaria: Revista virtual especializada en Gastronomía* No. 4 <Nueva Época> PP. 03 -28
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Roze`s, N., Mas, A. and Guillamo`n, J.M. (2005) Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J Agric Food Chem* 53, 996–1002.

- Benvenisty, N y Eden, A. (2000). The use of yeast strain to reduce the production of fusel oils (high alcohols) in alcoholic beverages. <http://www.vissum.co.il>
- Berg, Jeremy; Stryer, Lubert; Tymoczko, John L. (2007). *Bioquímica*. Editorial Reverte. Pp. 446-447.
- Bohlscheid, J.C., Fellman, J.K., Wang, X.D., Ansen, D. y Edwards, C.G. (2007). The influence of nitrogen and biotin interactions in the performance of *Saccharomyces* in alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 102, 390-400.
- Carrillo, L.; Audisio, M. C. (2007) *Manual de microbiología de los alimentos*. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias. Pp 40-45.
- Castro-Díaz, A.S. y Guerrero-Beltrán, J.A (2013). *El agave y sus productos*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7 - 2: 53-61
- Cedeño, M. (1995). Tequila production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15:1-11.
- Cole, V.C., Noble, A.C., 1997. Flavour chemistry and assessment. In: *Fermented Beverage Production*. A.G.H., Piggott, J.R. (Eds.), *Kluwer Academic/ Plenum Publishers New York*. pp:393-396.
- Consejo Regulador del Mezcal. Página oficial: <http://www.crm.org.mx/>
Consultado por última vez en noviembre de 2016.
- Contreras D., Camilo; Ortega R., Isabel. (2005) *Bebidas y regiones: historia e impacto de la cultura etílica en México*. Plaza y Valdés. México. p. 64.
- De la Torre, F. (2010). *Caracterización Cinético-Molecular de Microorganismos en Mostos de Mezcal*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Centro de Biotecnología Genómica, IPN, Tamaulipas. pp. 3
- De León-Rodríguez A, L González-Hernández, A P Barba de la Rosa, P Escalante-Minakata, M G López (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 54:1337-1341.
- Delfini C, J Formica (2001) *Wine Microbiology: Science and Technology*. *Marcel Dekker, Inc.* Italy. pp:266, 339.
- Díaz M., D.; D. Marie L., M. Estarrón E. y P. Strehaiano(2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. *Enzyme Microbial Technology* (42):608-616.

- Diguet, Léon. *Por tierras occidentales: entre sierras y barrancas*. Nueva edición [en línea]. Mexico: Centro de estudios mexicanos y centroamericanos, 2005 (generado el 28 septiembre 2016). Disponible en Internet: <<http://books.openedition.org/cemca/1417>>. ISBN: 9782821827967.
- Fermentis (2010). *Tequila: Guía sobre levaduras y fermentación para la industria tequilera*. Disponible en: <http://www.fermentis.com/wpcontent/uploads/2011/01/pourleWeb.pdf>
- Fernández G., M.; Barraón, N.; Díaz H., P.; Úbeda, J. (2012). Comparación de la cinética de fermentación de 27 cepas de *Saccharomyces Cerevisiae* vínicas en mostos muy azucarados. Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM).
- Folch Mallol, J.; Garay-Arroyo, A.; Lledías, F.; Covarrubias, A. (2004) La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 46, Núms. 1-2. Pp. 24-25.
- García G., Mariano; Quintero R., Rodolfo; López-Munguía, Agustín (1993). *Bioteología alimentaria*. Editorial Limusa. 267-268.
- García-Herrera, E., Méndez-Gallegos, S. y Talavera-Magaña, D. (2010). El género *Agave spp.* en México principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN*. Edición especial. 5, 109-127.
- Herrera M, (2008) *Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Marina. CICESE Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California. pp.1-70.
- Hidalgo, J. (2010). *Tratado de Enología*. 2ª edición. Ediciones Minda de Noboa. Pp. 579-58.
- Illsley G., Catarina (2004). Manual de manejo campesino de magueyes mezcaleros silvestres. Grupo de Estudios Ambientales.
- Jacques, K.A.; Lyons, T.P.; Kelsall, D.R. (2003) *The Alcohol Textbook. Alotechnology*. Reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. Nottingham University Press.
- Joslyn, M. (1951). Nutrient requirements of yeast. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 5(2), 260-276.

- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (2011) *The yeasts. A taxonomic Study*. Descriptions of Telemorphic Ascomycetous Genere and Species. Parte IV B. 5th edition. Volume 1. Pp. 689.
- Lachenmeier, D.; Sohnius, E.; Atting, R.; López, M. (2007). Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3911-3915.
- Lappe-Oliveras, P., R. Moreno-Terrazas, J. Arrizon-Gaviño, T. Herrera-Suárez, A. García-Mendoza, y A. Gschaedler-Mathis. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8:1037-1052.
- Leal G., Iván; Chirinos, Elisabeth; Leal, Mayra; Morán, Héctor; Barrera, Wilmer (2003). Caracterización fisicoquímica de la vinaza del *Agave cocui* y su posible uso agroindustrial *Revista Multiciencias*, vol. 3, núm. 2.
- López, J.A.; Díaz, A.L.; Campos, J. (2012) Estudio comparativo de rendimiento y contenido de compuestos volátiles en un proceso de elaboración de Tequila a nivel industrial. *Ciencia Nicolaita* No. 57. Pp 43-44.
- López M G (1999) *Tequila Aroma*. In: *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. F Shahidi, Ch Ho (eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp:211-217.
- Madigan, T.; Parker, J. (2009) *Biología de los microorganismos*. Brock. Pearson Education. 12° Edición, 133-136.
- Mancilla, M. A., N.; López, M. (2002) Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana weber* var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 50: 806-812.
- Mauricio, J.C. and Salmon, J.M. (1992) Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnol Lett* 14, 577–582.
- Medina, M. (2008). Cuantificación de alcoholes y aldehídos en mezcal por cromatografía de gases. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A. and Leao, C. (2004) Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium

concentrations and its implications in wine making industry. *J Appl Microbiol* 97, 540–545.

- Molina-Guerrero, J. A.; Botello-Álvarez, J. E.; Estrada-Baltazar, A.; Navarrete-Bolaños, J. L.; Jiménez-Islas, H.; Cárdenas-Manríquez, M.; Rico-Martínez, R. (2007) Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 6, No. 1 pp. 41-50.
- Munoz, E.; Ingledew, W. M. (1989). Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: Importance of the lipid component. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1560-1564.
- Murtagh, J. E. (1995). *The alcohol alphabet En The Alcohol Textbook. Ethanol Production by Fermentation and Destilation*. Ed. Por Lyons, T.P.; Kelsall, D. R. y Murtagh, J. E. Nottingham. Pp.297-328.
- NOM-006-SCFI-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- NOM-070-SCFI-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- Otero, M.A; Saura, G.; Martínez, J.A.; Chávez-Solera, M. (2006). Políticas y marco legal del alcohol carburante en Costa Rica, *Memorias IX Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados*, La Habana Junio 14-17.
- Pérez M., Ana (2012). Estudio del refinamiento del aceite de fusel proveniente de una industria fermentativa mediante el enriquecimiento del contenido de alcohol isoamílico a través de la técnica de rotaevaporación utilizando diferentes presiones de vacío a 60°C. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 5-10
- Pinal, L., Cedeño, M., Gutierrez, H. y Alvarez-Jacobs J. (1997). Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*. 19 (1):45-47.
- Posada, E. D. (1968). Aceite de Fusel: Fenómenos que determinan su producción. *Revista Cuba-Azúcar*, marzo/abril,10 -18.

- Ramírez, A. (2004). Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) para la cuantificación de Vitamina A. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Reyes, D. (2006). Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por cromatografía de gases capilar- espectrometría de masas. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2006) *Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Ríos del Risco, Carlos; Fajardo, Mario; Pérez, Juan Carlos. (2005). *Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 953-958.
- Salmon, J., Vincent, O., Mauricio, J., Bely, M.; Barre, P. (1993) Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am J Enol Vitic* 44, 56–64.
- Santillán-Valverde, María; García-Garibay, Mariano (1998). Biosíntesis de congenéricos durante las fermentaciones alcohólicas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 40: 109-119.
- Secretaría de Economía (SE). Página oficial: <http://www.2006-2012.economia.gob.mx/delegaciones-de-la-se/estatales/puebla/162-delegaciones-de-la-se/estatales/oaxaca/6724-oaxaca1>
Consultado por última vez en noviembre de 2016.
- Segura-García, L.; Taillandier, P.; Brandam, C.; Gschaedler, A. (2014) Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT-Food Science and Tech.* (60) 284-291.
- Suárez Lepe, J.A. (2004). Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. Mundi-Prensa. Madrid, España. 185-189.
- Suzzy, G.; Romano, P. y Polsinelli, M. (1998). Isolation and characterization of mutants resistant to amino acid analogues obtained from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 14, 243-246.

- Téllez M., P.; Peraza L., F.; Feria V, A. y Andrade G., I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Rev. Mex. Ing. Quím vol.11 no.1*
- Ter Schure, E., Flikweert, M., Van Dijken, J., Pronk, J. y Verrips, T. (1998). Piruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxoacids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (4):1303-1307.
- Vallejo-Cordoba, González-Córdova (1999) Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas Mex.* 8:1-17.
- Vallejo-Cordoba, B., A. González-Córdova, M. Estrada-Montoya. (2004). Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase micro-extraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5567-5571.
- Vargas, L. T.; Ponce, H. R.; Fernández, I. V.; Guzmán, A. L.; Santos, M. P., & Basurto, J. H. (2010). Complementos nutricionales para el rendimiento y nutrición del cultivo de melón con fertirriego y acolchado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5-15.
- Vera, Araceli; Santiago, Patricia; López, Mercedes. (2009) Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave Angustifolia* y *Agave Potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol. 32, Núm. 4, octubre-diciembre, 2009, pp. 273-279.
- Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, A. González, A., Coria, R. y Gschaedler, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentation from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhaek*, 100(4), 497-506.
- Walker, G. (1999). Yeast metabolism. En: *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons. Great Britain. 244-247.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J.C. y Edwards, C.G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349-359.

12 ANEXOS

12.1 Anexo 1. Curva de calibración y tiempo de retención de fructosa.

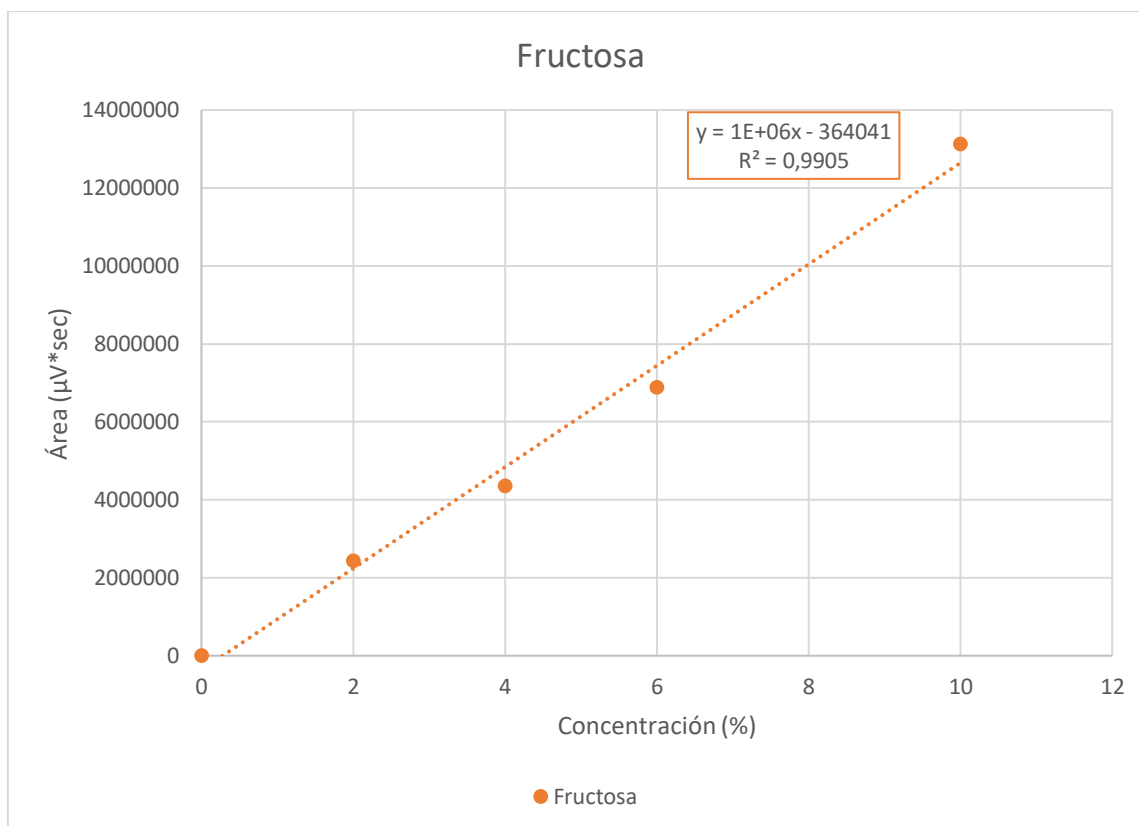


Figura 16. Curva patrón de fructosa por patrón externo. La curva representa el promedio de valores de los duplicados.

Los análisis se realizaron empleando cromatógrafo de líquidos Waters® 1525 equipado con un detector de índice de refracción Waters® 2414 y una columna Aminex® HPX-87, 300 mm x 7.8 mm con una temperatura del horno de 40°C. La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0.05 N, con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. La concentración de fructosa se determinó por el método de estándar externo, a partir de curvas de calibración. Se manejaron concentraciones de 0 a 10% v/v con intervalos de 2%. Se obtuvo un tiempo de retención de 12.35 ± 0.02 minutos, el tiempo de corrida fue de 15 minutos.

12.2 Anexo 2. Curvas de calibración de etanol y alcoholes superiores.

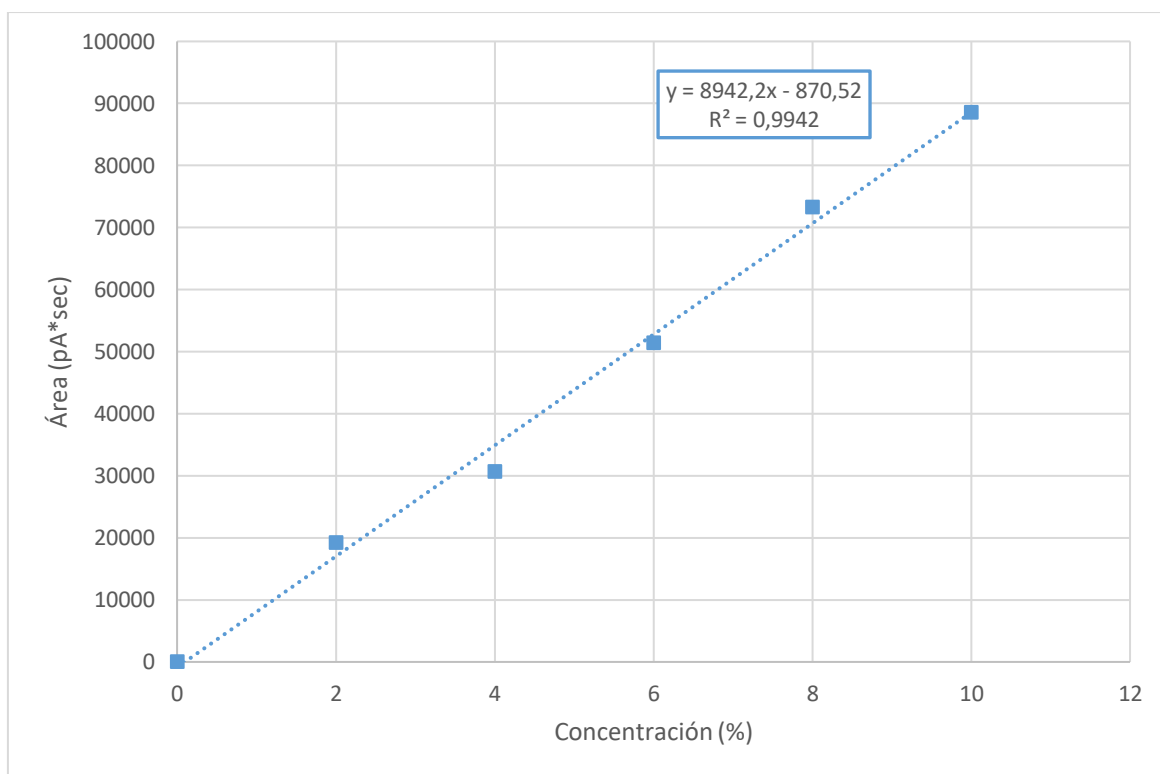


Figura 17. Curva patrón de etanol por patrón externo.

La determinación se realizó empleando un cromatógrafo de gases Alignet® 6890N provisto con un detector de ionización (FID) y una columna empacada Optima Wax® de 60 m x 0.25 mm. Previo a las inyecciones, se realizó una rampa de calentamiento la cual consistió en calentar el horno a 40°C por 5 minutos con incrementos de 5°C/min hasta alcanzar una temperatura de 140°C y posteriormente de 10°C/min hasta alcanzar 240°C. La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C. Los flujos de los gases fueron: H₂ a 40 mL/min, aire a 400 mL/min y N₂ a 28.3 mL/min. El tiempo de corrida fue de 45 minutos.

En el caso de los alcoholes superiores, se manejaron concentraciones de 0 a 100 ppm con intervalos de 20 ppm, mientras que, para el etanol, las concentraciones fueron de 0 a 10%v/v con intervalos de 2%.

Los tiempos de retención fueron: a) etanol 7.22 ± 0.03 min, b) propanol 10.20 ± 0.01 min, c) isobutanol 12.21 ± 0.02 min, d) alcohol amílico 15.95 ± 0.01 min y alcohol isoamílico 16.01 ± 0.01 min.

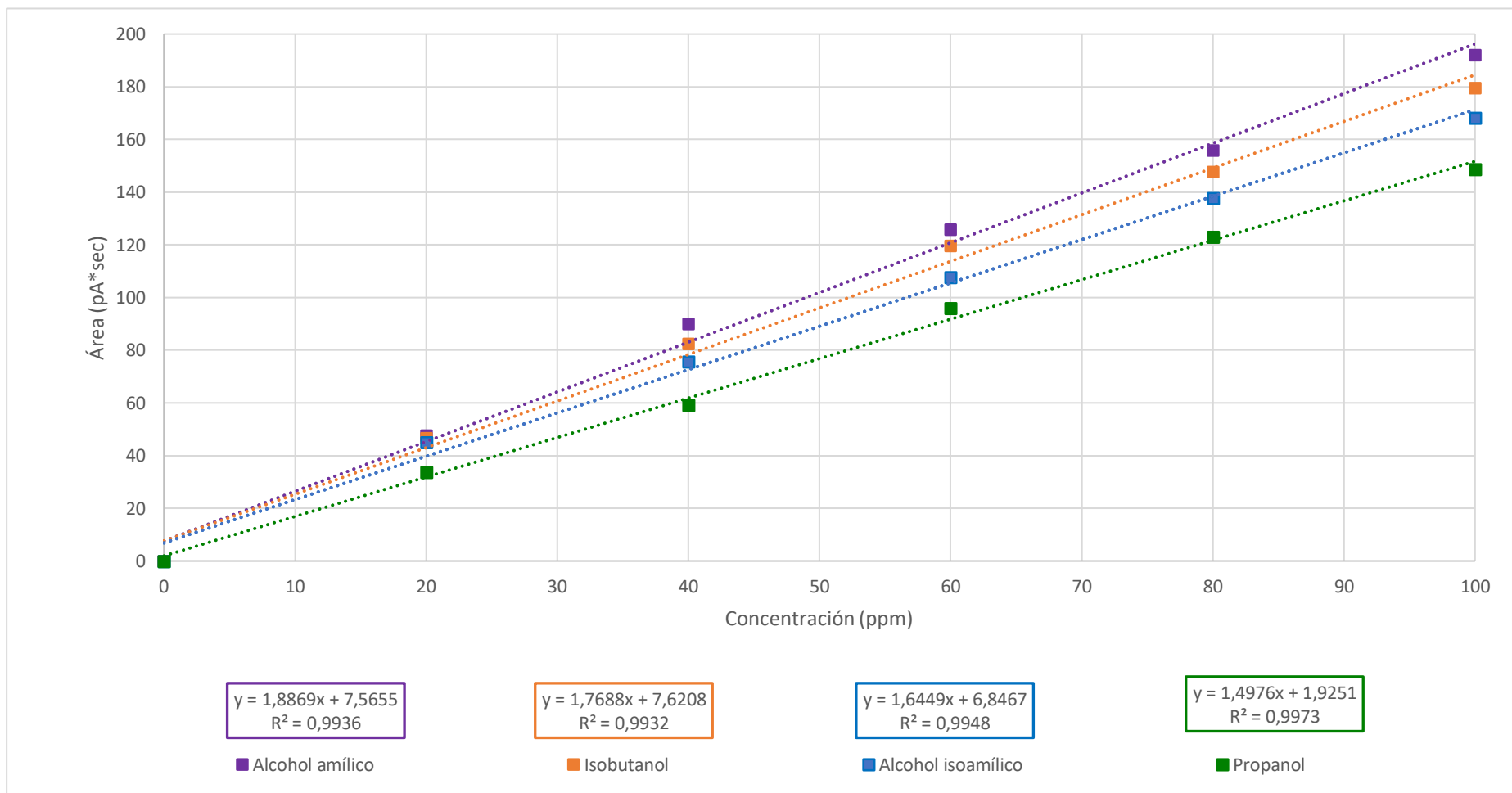


Figura 18. Curva patrón de alcoholes superiores por patrón externo. Cada curva representa el promedio de valores de los duplicados.

12.3 Anexo 3. Cálculos de consumo de sustrato y rendimiento del producto.

12.3.1 Consumo de fructosa (%)

$$\text{Consumo de fructosa (\%)} = \frac{\%fructosa_i - \%fructosa_f}{\%fructosa_i} * 100$$

Ejemplo (Lote 2- Medio sintético 100 ppm Valina):

$$\text{Consumo de fructosa(\%)} = \frac{9.5\% - 0.51\%}{9.5\%} * 100 = 94.62\%$$

12.3.2 Rendimiento de etanol con respecto al sustrato

$$Y_{p/s} = \frac{|\Delta P|}{|\Delta S|} = \frac{|P_f - P_i|}{|S_f - S_i|} = \frac{\text{g producto}}{\text{g sustrato consumido}}$$

Ejemplo (Lote 1- Mosto SN 100 ppm):

$$Y_{p/s} = \frac{|\Delta P|}{|\Delta S|} = \left| \frac{3.44\text{g} - 0\text{g}}{3.31\text{g} - 24.79\text{g}} \right| = 0.16\text{ g}$$

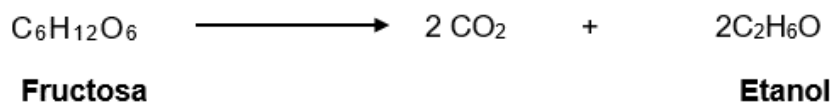
12.3.3 Rendimiento de etanol (%)

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = \frac{\text{g de etanol producido exp.}}{\text{g de etanol teórico}} * 100$$

Ejemplo (Lote 1- Medio sintético 300 ppm (NH₄)₂PO₄):

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = \frac{4.36\text{ g}}{11.67\text{ g}} * 100 = 37.35\%$$

La cantidad teórica de etanol se calculó mediante un balance de materia empleando la siguiente reacción:



Considerando que por cada mol de fructosa que se fermente, se generará dos mol de etanol. Se considera que, en el caso del medio sintético se tenía una concentración de glucosa de 9.5%, mientras que en el mosto de agave se tenía 10.33 %; al encontrarse en un volumen de 240 mL, los gramos de fructosa se calcularon de la siguiente manera:

$$240 \text{ mL} \times \frac{9.5 \text{ g fructosa}}{100 \text{ mL}} = 22.80 \text{ g de fructosa}$$

Con este cálculo se obtuvo que la cantidad de fructosa presente en el medio sintético era de 22.8 g, mientras que en el mosto fue de 24.79 g.

Tomando en cuenta que la masa molar de la fructosa es 180.06 g/mol y la del etanol es 46.07 g/mol, la cantidad teórica de etanol se obtuvo de la siguiente forma:

$$22.8 \text{ g fructosa} \times \frac{1 \text{ mol fructosa}}{180.06 \text{ g fr.}} \times \frac{2 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol fructosa}} \times \frac{46.07 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}} = 11.67 \text{ g etanol}$$

Con este cálculo se obtuvo la cantidad de etanol teórica, para el medio sintético 11.67 y 12.69 g para el mosto.

12.4 Anexo 4. Análisis estadístico

Las determinaciones de los diferentes compuestos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron por medio del programa **StatAdvisor®**. Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para cada compuesto. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de los diferentes compuestos para los diferentes niveles de Tratamiento.

12.4.1 Comparación de los tratamientos con 100 ppm

Se realizaron dos comparaciones debido al número de factores manejados. La primera comparación incluye todos los tratamientos con 100 ppm de N, considerando que solo un factor era el tratamiento, independiente del Lote y del medio. Se definieron 6 niveles con 5 variables:

1. SN-100 Mosto Lote 1
2. SN-100 Mosto Lote 2
3. 100- fosfato de amonio medio sintético Lote 2
4. 100-valina medio sintético Lote 2
5. 100-leucina medio sintético Lote 2
6. 100 Isoleucina medio sintético Lote 2

A continuación, se muestran los análisis realizados para cada compuesto: etanol (Tabla 5 y 6), propanol (Tabla 7 y 8), isobutanol (Tabla 9 y 10), alcohol amílico (Tabla 11 y 12) y alcohol isoamílico (Tabla 13 y 14). También se realizaron análisis para el consumo de fructosa (Tabla 15 y 16), el rendimiento de etanol con respecto a la fructosa (Tabla 17 y 18) y el rendimiento de etanol experimental con respecto al teórico (Tabla 19 y 20).

Tabla 5. ANOVA para Etanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14.4448	5	2.8890	190.27	0.0000
Intra grupos	0.0911	6	0.0152		
Total (Corr.)	14.5359	11			

Tabla 6. Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100-Ile sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	0.87	0.3015
100-Ile sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-0.39	0.3015
100-Ile sintético L2 - 100-fosfato sintético L2		-0.04	0.3015
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	2.7	0.3015
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	1.72	0.3015
100-Leu sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-1.26	0.3015
100-Leu sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	-0.91	0.3015
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	1.83	0.3015
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	0.85	0.3015
100-Val sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	0.35	0.3015
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	3.09	0.3015
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	2.11	0.3015
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	2.74	0.3015
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	1.76	0.3015
SN-100 Mosto L1 - SN-100 Mosto L2	*	-0.98	0.3015

* indica una diferencia significativa.

Tabla 7. ANOVA para Propanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	233.44	5	46.688	688.70	0.0000
Intra grupos	0.40675	6	0.0678		
Total (Corr.)	233.847	11			

Tabla 8. Pruebas de Múltiple Rangos para Propanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100-Ile sintético L2 - 100-Leu sintético L2		-0.375	0.6371
100-Ile sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-2.15	0.6371
100-Ile sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	-7.075	0.6371
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	3.165	0.6371
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	7.21	0.6371
100-Leu sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-1.775	0.6371
100-Leu sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	-6.7	0.6371
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	3.54	0.6371
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	7.585	0.6371
100-Val sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	-4.925	0.6371
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	5.315	0.6371
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	9.36	0.6371
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	10.24	0.6371
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	14.285	0.6371
SN-100 Mosto L1 - SN-100 Mosto L2	*	4.045	0.6371

* indica una diferencia significativa.

Tabla 9. ANOVA para Isobutanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17927.8	5	3585.56	2557.22	0.0000
Intra grupos	8.4128	6	1.4021		
Total (Corr.)	17936.2	11			

Tabla 10. Pruebas de Múltiple Rangos para Isobutanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100-Ile sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	18.39	2.89744
100-Ile sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-71.68	2.89744
100-Ile sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	18.155	2.89744
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	46.21	2.89744
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	37.665	2.89744
100-Leu sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-90.07	2.89744
100-Leu sintético L2 - 100-fosfato sintético L2		-0.235	2.89744
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	27.82	2.89744
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	19.275	2.89744
100-Val sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	89.835	2.89744
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	117.89	2.89744
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	109.345	2.89744
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	28.055	2.89744
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	19.51	2.89744
SN-100 Mosto L1 - SN-100 Mosto L2	*	-8.545	2.89744

* indica una diferencia significativa.

Tabla 11. ANOVA para Alcohol amílico por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17333.2	5	3466.64	11759.95	0.0000
Intra grupos	1.7687	6	0.2948		
Total (Corr.)	17335.0	11			

Tabla 12. Pruebas de Múltiple Rangos para Alcohol amílico por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100-Ile sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	101.855	1.32853
100-Ile sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	91.375	1.32853
100-Ile sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	100.73	1.32853
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	108.465	1.32853
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	102.955	1.32853
100-Leu sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-10.48	1.32853
100-Leu sintético L2 - 100-fosfato sintético L2		-1.125	1.32853
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	6.61	1.32853
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L2		1.1	1.32853
100-Val sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	9.355	1.32853
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	17.09	1.32853
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	11.58	1.32853
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	7.735	1.32853
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	2.225	1.32853
SN-100 Mosto L1 - SN-100 Mosto L2	*	-5.51	1.32853

* indica una diferencia significativa.

Tabla 13. ANOVA para Alcohol Isoamílico por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	19467.2	5	3893.44	7282.57	0.0000
Intra grupos	3.20775	6	0.534625		
Total (Corr.)	19470.4	11			

Tabla 14. Pruebas de Múltiple Rangos para Alcohol Isoamílico por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
100-Ile sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	-77.85	1.78914
100-Ile sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-3.99	1.78914
100-Ile sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	16.585	1.78914
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	41.435	1.78914
100-Ile sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	41.435	1.78914
100-Leu sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	73.86	1.78914
100-Leu sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	94.435	1.78914
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	119.285	1.78914
100-Leu sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	119.285	1.78914
100-Val sintético L2 - 100-fosfato sintético L2	*	20.575	1.78914
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	45.425	1.78914
100-Val sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	45.425	1.78914
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L1	*	24.85	1.78914
100-fosfato sintético L2 - SN-100 Mosto L2	*	24.85	1.78914
SN-100 Mosto L1 - SN-100 Mosto L2		0.0	1.78914

* indica una diferencia significativa.

Tabla 15. ANOVA para Consumo de Fructosa por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	350.401	5	70.0801	418.91	0.0000
Intra grupos	1.00375	6	0.1673		
Total (Corr.)	351.404	11			

Tabla 16. Pruebas de Múltiple Rangos para Consumo de Fructosa por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
SN-100 Mosto L1 - SN- 100 Mosto L2	*	-5.13	1.00082
SN-100 Mosto L1 - 100-Fosfato sintético L2	*	-14.395	1.00082
SN-100 Mosto L1 - 100-Val sintético L2	*	-13.06	1.00082
SN-100 Mosto L1 - 100-Leu sintético L2	*	-13.495	1.00082
SN-100 Mosto L1 - 100-Ile sintético L2	*	-13.265	1.00082
SN- 100 Mosto L2 - 100-Fosfato sintético L2	*	-9.265	1.00082
SN- 100 Mosto L2 - 100-Val sintético L2	*	-7.93	1.00082
SN- 100 Mosto L2 - 100-Leu sintético L2	*	-8.365	1.00082
SN- 100 Mosto L2 - 100-Ile sintético L2	*	-8.135	1.00082
100-Fosfato sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	1.335	1.00082
100-Fosfato sintético L2 - 100-Leu sintético L2		0.9	1.00082
100-Fosfato sintético L2 - 100-Ile sintético L2	*	1.13	1.00082
100-Val sintético L2 - 100-Leu sintético L2		-0.435	1.00082
100-Val sintético L2 - 100-Ile sintético L2		-0.205	1.00082
100-Leu sintético L2 - 100-Ile sintético L2		0.23	1.00082

* indica una diferencia significativa.

Tabla 17. ANOVA para Rendimiento de Etanol con respecto a Fructosa por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.170867	5	0.0341733	2050.40	0.0000
Intra grupos	0.0001	6	0.0000167		
Total (Corr.)	0.170967	11			

Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento de Etanol: Fructosa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
SN-100 Mosto L1 - SN- 100 Mosto L2	*	-0.1	0.0099895
SN-100 Mosto L1 - 100–Fosfato sintético L2	*	-0.295	0.0099895
SN-100 Mosto L1 - 100-Val sintético L2	*	-0.335	0.0099895
SN-100 Mosto L1 - 100-Leu sintético L2	*	-0.19	0.0099895
SN-100 Mosto L1 - 100-Ile sintético L2	*	-0.29	0.0099895
SN- 100 Mosto L2 - 100–Fosfato sintético L2	*	-0.195	0.0099895
SN- 100 Mosto L2 - 100-Val sintético L2	*	-0.235	0.0099895
SN- 100 Mosto L2 - 100-Leu sintético L2	*	-0.09	0.0099895
SN- 100 Mosto L2 - 100-Ile sintético L2	*	-0.19	0.0099895
100–Fosfato sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-0.04	0.0099895
100–Fosfato sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	0.105	0.0099895
100–Fosfato sintético L2 - 100-Ile sintético L2		0.005	0.0099895
100-Val sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	0.145	0.0099895
100-Val sintético L2 - 100-Ile sintético L2	*	0.045	0.0099895
100-Leu sintético L2 - 100-Ile sintético L2	*	-0.1	0.0099895

* indica una diferencia significativa.

Tabla 19. ANOVA para Rendimiento de Etanol (Experimental vs. Teórico)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6356.23	5	1271.25	3960.88	0.0000
Intra grupos	1.9257	6	0.32095		
Total (Corr.)	6358.15	11			

Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento de Etanol (Experimental vs. Teórico)

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
SN-100 Mosto L1 - SN- 100 Mosto L2	*	-18.21	1.38624
SN-100 Mosto L1 - 100–Fosfato sintético L2	*	-56.695	1.38624
SN-100 Mosto L1 - 100-Val sintético L2	*	-63.955	1.38624
SN-100 Mosto L1 - 100-Leu sintético L2	*	-37.595	1.38624
SN-100 Mosto L1 - 100-Ile sintético L2	*	-55.955	1.38624
SN- 100 Mosto L2 - 100–Fosfato sintético L2	*	-38.485	1.38624
SN- 100 Mosto L2 - 100-Val sintético L2	*	-45.745	1.38624
SN- 100 Mosto L2 - 100-Leu sintético L2	*	-19.385	1.38624
SN- 100 Mosto L2 - 100-Ile sintético L2	*	-37.745	1.38624
100–Fosfato sintético L2 - 100-Val sintético L2	*	-7.26	1.38624
100–Fosfato sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	19.1	1.38624
100–Fosfato sintético L2 - 100-Ile sintético L2		0.74	1.38624
100-Val sintético L2 - 100-Leu sintético L2	*	26.36	1.38624
100-Val sintético L2 - 100-Ile sintético L2	*	8.0	1.38624
100-Leu sintético L2 - 100-Ile sintético L2	*	-18.36	1.38624

* indica una diferencia significativa.

12.4.2 Comparación de los tratamientos con 200 ppm

La segunda comparación fue con 200 ppm de N. Se definieron 4 niveles y 5 variables.

1. 200-fosfato de amonio, Mosto Lote 1
2. 200-Valina, Mosto Lote 2
3. 200-leucina, mosto Lote 2
4. 200-isoleucina, mosto lote 2

A continuación, se muestran los análisis realizados para cada compuesto: etanol (Tabla 21 y 22), propanol (Tabla 23 y 24), isobutanol (Tabla 25 y 26), alcohol amílico (Tabla 27 y 28) y alcohol isoamílico (Tabla 29 y 30). También se realizaron análisis para el consumo de fructosa (Tabla 31 y 32), el rendimiento de etanol con respecto a la fructosa (Tabla 33 y 34) y el rendimiento de etanol experimental con respecto al teórico (Tabla 35 y 36).

Tabla 21. ANOVA para Etanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.13125	3	0.04375	3.13	0.1496
Intra grupos	0.0559	4	0.01398		
Total (Corr.)	0.18715	7			

Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Fosfato Mosto L1 - Ile Mosto L2		-0.08	0.328221
Fosfato Mosto L1 - Leu Mosto L2		-0.165	0.328221
Fosfato Mosto L1 - Val Mosto L2	*	-0.345	0.328221
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2		-0.085	0.328221
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2		-0.265	0.328221
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2		-0.18	0.328221

* indica una diferencia significativa.

Tabla 23. ANOVA para Propanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	24.7863	3	8.26211	8160.11	0.0000
Intra grupos	0.00405	4	0.00101		
Total (Corr.)	24.7904	7			

Tabla 24. Pruebas de Múltiple Rangos para Propanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Fosfato Mosto L1 - Ile Mosto L2	*	4.065	0.0883462
Fosfato Mosto L1 - Leu Mosto L2	*	4.065	0.0883462
Fosfato Mosto L1 - Val Mosto L2	*	4.065	0.0883462
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2		0.0	0.0883462
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2		0.0	0.0883462
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2		0.0	0.0883462

* indica una diferencia significativa.

Tabla 25. ANOVA para Isobutanol por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	478.421	3	159.474	39255.07	0.0000
Intra grupos	0.01625	4	0.00406		
Total (Corr.)	478.437	7			

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos para Isobutanol por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Fosfato Mosto L1 - Ile Mosto L2	*	1.17	0.176965
Fosfato Mosto L1 - Leu Mosto L2	*	1.17	0.176965
Fosfato Mosto L1 - Val Mosto L2	*	-17.045	0.176965
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2		0.0	0.176965
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-18.215	0.176965
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-18.215	0.176965

* indica una diferencia significativa.

Tabla 27. ANOVA para Alcohol amílico por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	505.496	3	168.499	758.62	0.0000
Intra grupos	0.88845	4	0.222112		
Total (Corr.)	506.384	7			

Tabla 28. Pruebas de Múltiple Rangos para Alcohol amílico por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Fosfato Mosto L1 - Ile Mosto L2	*	-16.285	1.30851
Fosfato Mosto L1 - Leu Mosto L2	*	5.18	1.30851
Fosfato Mosto L1 - Val Mosto L2	*	-5.26	1.30851
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2	*	21.465	1.30851
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2	*	11.025	1.30851
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-10.44	1.30851

* indica una diferencia significativa.

Tabla 29. ANOVA para Alcohol Isoamílico por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1592.18	3	530.728	5241.76	0.0000
Intra grupos	0.405	4	0.10125		
Total (Corr.)	1592.59	7			

Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos para Alcohol Isoamílico por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Fosfato Mosto L1 - Ile Mosto L2		0.0	0.883462
Fosfato Mosto L1 - Leu Mosto L2	*	-32.58	0.883462
Fosfato Mosto L1 - Val Mosto L2		0.0	0.883462
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2	*	-32.58	0.883462
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2		0.0	0.883462
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2	*	32.58	0.883462

* indica una diferencia significativa.

Tabla 31. ANOVA para Consumo de Fructosa por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	56.0516	3	18.6839	44.65	0.0016
Intra grupos	1.67375	4	0.41844		
Total (Corr.)	57.7254	7			

Tabla 16. Pruebas de Múltiple Rangos para Consumo de Fructosa por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2	*	5.63	1.796
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2	*	7.085	1.796
Ile Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	4.41	1.796
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2		1.455	1.796
Leu Mosto L2 - Fosfato Mosto L1		-1.22	1.796
Val Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	-2.675	1.796

* indica una diferencia significativa.

Tabla 17. ANOVA para Rendimiento de Etanol con respecto a Fructosa por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.002538	3	0.0008458	67.67	0.0007
Intra grupos	0.00005	4	0.0000125		
Total (Corr.)	0.002588	7			

Tabla 18. Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento de Etanol con respecto a Fructosa por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2	*	-0.02	0.009816
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-0.04	0.009816
Ile Mosto L2 - Fosfato Mosto L1		0.005	0.009816
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-0.02	0.009816
Leu Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	0.025	0.009816
Val Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	0.045	0.009816

* indica una diferencia significativa.

Tabla 19. ANOVA para Rendimiento de Etanol experimental con respecto al teórico por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	47.0477	3	15.6826	227.16	0.0001
Intra grupos	0.27615	4	0.06904		
Total (Corr.)	47.3239	7			

Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento de Etanol experimental con respecto al teórico por Tratamiento

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ile Mosto L2 - Leu Mosto L2	*	-1.575	0.729513
Ile Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-5.005	0.729513
Ile Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	1.535	0.729513
Leu Mosto L2 - Val Mosto L2	*	-3.43	0.729513
Leu Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	3.11	0.729513
Val Mosto L2 - Fosfato Mosto L1	*	6.54	0.729513

* indica una diferencia significativa.