



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS PRESENTES
EN EXTRACTOS DE MOSTOS DURANTE LA
PRODUCCIÓN DEL MEZCAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

LUIS ENRIQUE MÉNDEZ RANGEL

ASESOR

DR. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

Morelia, Michoacán, Diciembre del 2008.



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS PRESENTES
EN EXTRACTOS DE MOSTOS DURANTE LA
PRODUCCIÓN DEL MEZCAL”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

LUIS ENRIQUE MÉNDEZ RANGEL

ASESOR

DR. MA. DEL CARMEN CHÁVEZ PARGA

ASESOR EXTERNO

M. en C. EDGAR LEÓN ESPARZA IBARRA

Morelia, Michoacán, Diciembre del 2008.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES

Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga, por haberme mostrado un nuevo campo de investigación como lo es la biotecnología y haberme impulsado durante la realización de este trabajo, y al **M. en C. Edgar León Esparza Ibarra**, por haberme ayudado a obtener todos los conocimientos requeridos para la realización de la tesis, por su apoyo y su paciencia durante las jornadas de trabajo en el estado de Zacatecas.

A MIS MAESTROS

A todos aquellos que formaron parte del grupo de profesores en todo lo que fue mi formación como estudiante, por todos los conocimientos que me enseñaron cada uno de ellos al paso de los años, los cuales me permiten hoy realizarme como profesionalista.

A LA UAZ

El Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica de Biología Experimental perteneciente a la Universidad Autónoma de Zacatecas y a cargo del **M. en C. Edgar León Esparza Ibarra**, por haber brindado todas las facilidades para la realización de esta tesis durante mi estancia en Zacatecas.

ASI COMO AL

Dr. Horacio González Rodríguez, I.Q. Pablo Antonio Palencia Salinas, Dr. Ma. Del Carmen Chávez Parga y al Dr. Luis Ignacio Salcedo Estrada, por haber formado parte de mi mesa de jurado y por medio de sus observaciones contribuir con mi crecimiento profesional.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la formación profesional como **Ingeniero Químico**

DEDICATORIA

A mis padres, Enrique Fernando Méndez Silva, porque más que mi padre ha sido mi maestro durante toda la vida, por tu sabiduría, por tu paciencia, por tu entrega, por demostrarme siempre que no hay nada que no se pueda hacer en este mundo **y Laura Leticia Rangel Suárez**, por haberme dado la vida, por tu inmenso amor, por enseñarme siempre a luchar por lo que quiero, por enseñarme a valorar correctamente las cosas y por ser mi hombro durante toda la vida. Gracias por todo. Los amo.

A mi hermano, Enrique Fernando Méndez Rangel, que siempre ha sido como un ejemplo para mí y que al igual que mis padres a estado conmigo en cada paso que doy por el sendero de la vida.

A mis amigos Jorge Arturo Vence Marín y J. Alfonso Villicaña González por todos los años de amistad que tenemos y en los cuales hemos tenido la oportunidad de vernos a cada uno de nosotros como profesionistas, por todas sus muestras de cariño y por todo el apoyo que siempre me han dado.

ÍNDICE

	Pág.
Financiamiento	iv
Glosario	v
Simbología	vii
Relación de Tablas	viii
Relación de Figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
1. Antecedentes generales	3
1.1. El mezcal	3
1.2. Orígenes e historia del mezcal	3
1.3. Procesos de obtención del mezcal	7
2. Antecedentes	17
2.1. La Inulina	17
2.1.1. Aplicaciones de la Inulina	19
2.2. Los azúcares reductores	20
2.3. Levaduras	21
2.3.1. Taxonomía	22
2.4. Enzimas	23
2.4.1. Inulinasas	26
2.4.1.1. Aplicaciones e inulinasas	27
2.4.2. Celulasas	27
2.4.2.1. Aplicaciones de celulasas	28
2.4.3. Xilanasas	29
2.4.3.1. Aplicaciones de xilanasas	31
2.4.4. Pectinasas	32
2.4.4.1. Aplicaciones de pectinasas	33
2.5. Cinética enzimática	34

2.5.1.	Cinética de las reacciones catalizadas por las enzimas	34
2.5.2.	Efecto del pH sobre la actividad enzimática	38
2.5.3.	Efecto de la Temperatura sobre las Reacciones Enzimáticas	39
2.5.4.	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática	40
	Justificación	41
2.6.	Objetivo general	42
2.6.1.	Objetivos particulares	42
2.7.	Hipótesis	42
3.	Metodología y desarrollo	43
3.1.	Localización del área de estudio	43
3.2.	Proceso de obtención del mezcal	43
3.3.	Material biológico	43
3.4.	Tratamiento y procesado de las muestras para su estudio	44
3.5.	Población celular y porcentaje de viabilidad	45
3.6.	Determinación de azúcares reductores	48
3.6.1.	Método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	48
3.7.	Determinación de proteínas	49
3.8.	Determinación de actividades enzimáticas	50
3.8.1.	Actividad inulolítica	50
3.8.2.	Actividad celulolítica	51
3.8.3.	Actividad xilanolítica	51
3.8.4.	Actividad pectinolítica	52
4.	Resultados y discusión	53
4.1.	Azúcares reductores	53
4.2.	Determinación de la población celular y porcentaje de viabilidad	54
4.3.	Inulinasas	55
4.4.	Celulasas	57
4.5.	Xilanasas	58
4.6.	Pectinasas	59
4.7.	Determinación de proteínas	60
5.	Conclusiones	62

5.1.	Sugerencias para trabajo a futuro	64
	Bibliografía	65
	Apéndice	71
A-1.	Determinación de azúcares	71
A-2.	Determinación de proteínas	75
A-3.	Determinación de enzimas	77
A-4.	Determinación de las constantes de velocidad K_M para las reacciones catalizadas por las diferentes enzimas estudiadas	81
A-5.	Obtención de la constante específica de crecimiento para la Levadura <i>Saccharomyces Cerevisae</i>	86
A-6.	Diagrama de flujo del proceso de obtención del mezcal	88

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Química de la Facultad de Química dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo el proyecto PROMEP “Apoyo a la incorporación de nuevo PTC SEP-23-005” con oficio 103 5/07/2830, UMSNH-PTC-140” y en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas; bajo el Financiamiento del Consejo de Productores de Agave de Mezcal en el Estado de Zacatecas con número de registro: UAZ-2007-35492.

GLOSARIO

Agave. Mezcal ó maguey.

Azúcares reductores. Monosacáridos que se obtienen de la hidrólisis de la inulina, los cuales son transformados en alcoholes por una levadura durante la fermentación alcohólica del maguey para producción del mezcal.

Celulasa. Enzima que actúa sobre los sustratos de celulosa.

Celulosa. Es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre. Es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. La pared de una célula vegetal joven contiene aproximadamente un 40% de celulosa

Enzima. Es un catalizador biológico fuerte debido a su gran esfericidad utilizado en procesos químicos que permite el aumento de la velocidad de reacción por medio de la disminución de la energía de activación.

Fermentación. Es el proceso químico mediante el cual los azúcares contenidos en el mosto se convierten en alcohol.

Inulina. Es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas moleculares de fructosa. Es, por lo tanto, un fructosano o fructano, que se encuentran generalmente en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas (achicoria, diente de león, yacón, maguey etc.) como sustancia de reserva. Forma parte de la fibra alimentaria. Su nombre procede de la primera planta que se aisló en 1804, el helenio (*Inula helenium*).

Inulinasa. Enzima que actúa sobre los sustratos de inulina.

Levadura. Es un hongo microscópico unicelular que es importante por su capacidad para realizar la *fermentación* de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

Mezcal. Nombre genérico que se le da en México a una bebida alcohólica obtenida de agave. Algunas veces también se denomina así a las plantas de agave que producen la bebida.

Mosto. Zumo obtenido del agave antes de su fermentación.

Pectina. Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales.

Pectinasa. Enzima que actúa sobre los sustratos de pectina.

Piña. Corazón del agave utilizado para la producción del mezcal; esta parte de la planta contiene los azúcares que, mediante el proceso industrial, se convierte en la bebida; está formada por la base de las pencas y el tallo o mezonte.

Xilanasa. Enzima que actúa sobre los sustratos de xilanos pertenecientes a la hemicelulosa.

Xilano. Polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones y sustituciones. El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa y es uno de los principales componentes de la hemicelulosa en la biomasa natural.

Sustrato. En bioquímica, un sustrato es una molécula sobre la que actúa una enzima.

SIMBOLOGÍA

Azúcares reductores totales	ART's
Densidad óptica	D. O.
<i>Dinitrosalicylic acid</i> (Acido 2,3-dinitrosalisilico)	DNS
<i>Enzyme Clasification</i>	EC
Figura	Fig
Grados centígrados	° C
Gramos	g
Hectáreas	Has.
Kilogramos	Kg
Litros	L
Microlitros	µL
Micromolar	µM
Miligramos	mg
Milimolar	mM
Mililitros	mL
Minutos	min
Molar	M
Normal	N
Número	No.
Por ciento	%
Por ciento de azúcares reductores totales	% ART's
Segundos	s
Toneladas	Ton
Ultravioleta	uv
Unidad	U
Versus	vs
Volumen	Vol.

RELACIÓN DE TABLAS

		Pág.
Tabla 2.1.	Ejemplo de jerarquías en la clasificación de las levaduras	22
Tabla 4.1.	Resultados de población celular y porciento de viabilidad de levaduras	52
Tabla 4.2.	Datos de proteínas en la fermentación	56
Tabla A-1	Para la determinación de azúcares reductores.	71
Tabla A-2.	Concentración y absorbancia de las tres soluciones estándar de DNS	73
Tabla A-3.	Valores tabulados para los límites de confianza	74
Tabla A-4.	Resultados de la validación para el ácido dinitrosalicílico (DNS)	74
Tabla A-5.	Detalle de valores para realizar la curva patrón de proteínas	76
Tabla A-6.	Preparación de la curva de calibración de fructuosa	78
Tabla A-7.	Datos para la determinación de la velocidad de reacción para inulinasas	82
Tabla A-8.	Datos para la determinación de la velocidad de reacción para celulasas	83
Tabla A-9.	Datos para la determinación de la velocidad de reacción para xilanasas	84
Tabla A-10.	Datos para la determinación de la velocidad de reacción para pectinasas	85
Tabla A-11.	Datos para la determinación de la constante de velocidad de Levaduras	87

RELACIÓN DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1.1. Mapa de las regiones productoras de agave y mezcal en el estado de Zacatecas	7
Fig. 2.1. Estructura base de la inulina	17
Fig. 2.2. Hidrólisis de la inulina	18
Fig. 2.3. Sitios de acción de la xilanasas involucradas en la hidrólisis del esqueleto principal del xilano. X ₄ , Xilotetrosa; X ₅ , Xilopentosa y X ₆ , Xilohexosa	30
Fig. 3.1. Piñas de agave <i>Weberi cela</i> (azul)	44
Fig. 3.2. Cámara de Neubauer	45
Fig. 3.3. Partes de la cámara de Neubauer	46
Fig. 3.4. Preparación de los tubos con DNS para la de curva de calibración y para las muestras	49
Fig. 4.1. Determinación de azúcares durante la fermentación	53
Fig. 4.2. Células de levaduras viables	54
Fig. 4.3. Células de levadura no viables (teñidas en azul)	54
Fig. 4.4. Curva de crecimiento celular de levaduras	55
Fig. 4.5. Actividad inulolítica en los mostos de fermentación	56
Fig. 4.6. Actividad celulolítica en los mostos de fermentación	57
Fig. 4.7. Actividad xilanolítica en los mostos de fermentación	58
Fig. 4.8. Actividad pectinolítica en los mostos de fermentación	59
Fig.4.9. Determinación de proteínas durante la fermentación	61
Fig. A-1. Curva de calibración de fructuosa para concentraciones mínimas	72
Fig. A-2. Curva de calibración de fructuosa	72
Fig. A-3. Curva de calibración de fructuosa para concentraciones máximas	73
Fig. A-4. Curva patrón de Albumina Sérica Bovina	76
Fig. A-5. Curva estándar de carboximetil celulosa	79

Fig. A-6.	Curva estándar de xilosa	80
Fig. A-7.	Obtención de la constante de velocidad para inulinasas.	82
Fig. A-8.	Obtención de la constante de velocidad para celulasas.	83
Fig. A-9	Obtención de la constante de velocidad para xilanasas.	84
Fig. A-10	Obtención de la constante de velocidad para pectinasas.	85
Fig. A-11	Constante de crecimiento de levaduras	87
Fig. A-12	Diagrama de flujo del proceso de obtención del mezcal	88

“CUANTIFICACIÓN DE ENZIMAS PRESENTES EN EXTRACTOS DE MOSTOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DEL MEZCAL”

RESUMEN

Zacatecas tiene una antigua tradición mezcalera y con ello una importante oportunidad de desarrollo económico para sus regiones, sin embargo en el proceso de producción de mezcal en las zonas productoras se ha venido presentando una problemática parecida a la ya existente en otros procesos agroindustriales, diariamente se desperdician cantidades enormes de mostos muertos de fermentación los cuales son ricos en diversos componentes que aún no han sido estudiados y que podrían bien ser fuente de un sin número de subproductos de importancia industrial y comercial, este problema debe ser atendido en términos de investigación, transferencia y desarrollo de nuevas de tecnologías. En el presente trabajo se realizó una cuantificación de las principales actividades enzimáticas que se encuentran en los mostos durante la producción del mezcal con el fin de valorar la cantidad de enzimas existentes y poder así determinar el tiempo más adecuado para su separación de la fermentación. Se emplearon muestras del proceso de producción de mezcal a partir del *Agave Weberi Cela* ó Agave azul, realizando visitas a la empresa “Hacienda de Robles” en el municipio de Teúl de González del estado de Zacatecas donde se recolectaron cada seis horas durante dos días, los mostos muertos de la fermentación. A estos se les determinó el porcentaje de azúcares reductores totales con un 2% de ART's al final del proceso, el crecimiento celular de levaduras con una velocidad específica de crecimiento μ de 0.1845 h^{-1} , y el porcentaje de viabilidad de levaduras; presentándose el mejor porcentaje a las 12 horas con valor de 92%. Las actividades enzimáticas encontradas fueron: actividad inulolítica con 3.5 U/ml y una K_M de 1.3606 mol/mL ., actividad celulolítica con 1.7 U / mL y K_M de 0.4854 mol / mL ., actividad xilanolítica con 3.62 U / mL y K_M de 1.0593 mol / mL y por último la actividad pectinolítica con 1.7 U / mL y K_M de 0.4331 mol / mL . Finalmente se determinó la producción de proteínas con valores constantes después de las 6 horas de fermentación de $1.69 \text{ } \mu\text{g / mL}$ a $2.06 \text{ } \mu\text{g / mL}$.

“QUANTIFICATION OF ENZYMES IN EXCERPTS OF MUSTS DURING THE PRODUCTION OF MEZCAL”

ABSTRACT

Zacatecas has a long *Mezcalero* tradition and thus an important opportunity for economic development in their regions, however the production of mezcal on the producing areas has been presenting a problem similar to that existing in other agro-industrial processes, daily huge amounts of dead musts of the fermentation which are rich in various components that have not yet been studied and that could well be the source of an endless number of sub-products of industrial and commercial importance are wasted. This problem must be solved in terms of research, transfer and development of new technologies. In the current study, was made a quantification of the most important enzyme activities that are involved on the production of mezcal, in order to know the amount of existing enzymes, and thus determine the most appropriate time for their separation from the fermentation. Samples of the production process of *mezcal*, produced from *Agave Weberi Cela* or blue *agave*, were used. Visits were made to the company “*Hacienda de Robles*” in the town of *Teúl de González Ortega* of the state of Zacatecas and were collected every six hours over two days the death musts of the fermentation. The samples were analyzed to find: the total percentage of reducing sugars with 2% of ART's at the end of the process, yeast cell growth with a specific speed of growth μ of 0.1845 h^{-1} and the viability percent of these; getting the best at 12 hours with a value of 92%. The found enzyme activities were: Inullolític activity with 3.5 U / mL and a K_M of 1.3606 mol / mL , Cellulolític activity with 1.7 U / mL and K_M of 0.4854 mol / mL , Xilanolític activity with 3.62 U / mL and K_M of 1.0593 mol / mL and finally the pectinolític activity with 1.7 U / mL and K_M of 0.4331 mol / mL . Finally it was determined the production of proteins with constant values after the six hours of the fermentation of 1.69 mg / mL to 2.06 mg / mL .

INTRODUCCION

El maguey o agave se ha reportado en América con 310 especies aproximadamente de las cuales en México existen 272, por ello es considerado como el centro de origen. Por otro lado, algunas regiones de nuestro país cimentaron su desarrollo económico en el aprovechamiento del maguey, particularmente en los estados de Hidalgo, Tlaxcala y México, debido al alto grado de desarrollo que alcanzó la agroindustria del pulque. En el siglo XVIII, el cultivo y aprovechamiento del maguey fue la principal fuente de riqueza en el estado de Hidalgo. Mientras que el mezcal en los estados comprendidos en el altiplano zacatecano-potosino, después de la minería, fue la principal industria captadora de divisas, como lo pueden demostrar así más de 26 fábricas establecidas en la región con un alto grado de desarrollo tecnológico para su tiempo (SEDEZAC, 2004).

Por otro lado, el alto desarrollo que ha alcanzado la agroindustria del tequila en gran medida ha sido a costa de la degradación de ecosistemas magueyeros de algunos estados que disponen de poblaciones naturales de maguey. Es vergonzoso manifestar que la crisis y el desabasto de materia prima en el estado de Jalisco en 1999 debido a la presencia de *Erwinia Carotobora* (Sida del Maguey), provocó un desabasto significativo de materia prima para satisfacer los compromisos contraídos a nivel internacional en el surtimiento de tequila. Esto aunado a la ambición de acaparamiento del mercado mundial de la bebida elaborada con la protección de una norma leonina (51/49), que especifica que para la elaboración de esta, el 51% de los azúcares pueden ser del maguey y el resto de otros. Con este pretexto los industriales del tequila implementaron un programa de rapiña en diferentes estados con disponibilidad de magueyes (Oaxaca, Guerrero, Morelos, Durango, San Luis Potosí), el caso más lamentable es el que se suscitó en el estado de Zacatecas donde se llegó a implementar en complicidad con la SEMARNAT y la PROFEPA, un programa que fue el más grande intento de ecocidio en contra del maguey, al amarrar a más de 26 ejidos magueyeros del Sureste Zacatecano con contratos para el abastecimiento de materia prima por 25 años a 0.50 centavos la unidad vegetal de

hasta 15 kilogramos de peso. Esta acción en principio significó un alto grado de deforestación, desculturización y la desaparición de una de las actividades que desde el siglo antepasado fue orgullo de esta región: la producción de mezcal (Medina, 2001).

Por todo lo anterior, para la producción de mezcal, es necesario volver la vista atrás y tomar acciones para restituir todo el daño ocasionado. Por ello es necesario fortalecer la industria del mezcal en los estados con denominación de origen, en este caso del estado de Zacatecas; siendo una alternativa viable la implementación de paquetes tecnológicos que permitan tener un mayor control en la medida de los parámetros fisicoquímicos del mezcal, teniendo la característica de que sean sencillos y fácilmente operables por los empleados de las fabricas productoras de mezcal. En el presente trabajo se midieron los azúcares reductores por el método del DNS, ya que estos influyen directamente en la cantidad de producto final obtenido de la fermentación; así como se vio la cinética de crecimiento y concentración de proteínas por el método de Bradford durante la fermentación del mezcal. Por otra parte, se investigó la presencia de las principales actividades enzimáticas en todo el proceso de producción con el fin de conocer en qué cantidad se encuentran presentes, donde el siguiente paso a futuro sería caracterizarlas y determinar su aplicación industrial y comercial en procesos biotecnológicos.

ANTECEDENTES GENERALES

1.1. El mezcal

Se define al mezcal como una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas (piñas) maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible a ser enriquecido, para el caso del mezcal Tipo II, con hasta en 20 % de otros carbohidratos permitidos por la Secretaría de Salud en la preparación de los mostos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le den las características a este producto, sin permitir las mezclas en frío (NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones, 2004.).

El mezcal es un líquido de olor y sabor *sui generis* de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo.

1.2. Orígenes e historia del mezcal

Nuestro país con una gran biodiversidad, alberga una gran cantidad de especies de flora y fauna en los distintos ecosistemas. Dos terceras partes del territorio nacional están compuestas por zonas áridas en donde se conocen las más extrañas formas de crecimiento de las plantas, una de las familias con mayor número de individuos son las cactáceas (familia del nopal) con gran importancia económica, pero también se encuentra la familia *Agavacea*, que en la actualidad son recursos no maderables con alto valor comercial.

El agave, es llamado 'la planta del siglo', 'Aloe del siglo' y 'Aloe americana'. Obtuvo su nombre de la palabra griega 'agavos' que significa 'ilustre' o 'admirable',

apta para describir algunas plantas nobles y magnificentes. En la historia del Nuevo Mundo, el agave ha sido estrechamente asociado con el hombre de diversas maneras, tanto con los habitantes de Meso-América como, en consecuencia, con los invasores y conquistadores provenientes de Europa.

La palabra ‘Chalchihuatl’, que significa ‘líquido precioso’, se usó para referirse al ‘jugo de agave’. En el periodo prehispánico se sabía que para extraer el jugo de la mejor calidad, era necesario castrar a la planta de agave al remover las estructuras reproductivas (embriones) o la inflorescencia y las semillas, para que el azúcar rico en nutrientes, elaborado en las hojas y transportado hacia el corazón o ‘piña’ de la planta, produjera una bebida de alta calidad. Al realizar la actividad de castración de magueyes, los aztecas consideraban que también despojaban a “Huitzilopochtli” o “colibrí polinizante”, de su sustento y por lo tanto, había que hacer enmiendas mediante sacrificios.

A su vez, la palabra México deriva de la voz náhuatl ME “metl”, planta o maguey; XI “xictli”, ombligo o centro; CO desinencia de lugar. Significa “El centro del maguey”, y siguiendo el pensar indígena en su sistema filosófico se interpreta como “El lugar donde se genera la vida”.

Tras el asombro inicial al conocer la cultura del maguey y de cuantos beneficios obtenían los pueblos conquistados de esta planta, y como suele suceder en los procesos de colonización, los españoles traen consigo tecnologías y métodos de producción que se van imponiendo progresivamente a medida que los usos tradicionales van desapareciendo, adaptándose como en el caso del pulque, o fusionándose como en el caso del mezcal (Aguirre Rivera, 2001).

Las primeras referencias al mezcal como bebida datan de los primeros años del siglo XVII. Y es por esta época que se constituyen las primeras haciendas, algunas de las cuales se especializan en la producción de mezcales. Además estos procesos semiindustriales, comienzan a funcionar otras destilerías familiares o de

autoconsumo. Los sucesivos gobiernos y las autoridades de todos los niveles de la época virreinal mantienen una postura ambigua respecto a la producción de mezcal, permitiendo y estimulando su producción en ocasiones, y frenándola o llegando a prohibirla en otras. Esta ambigüedad se generó debido a varias situaciones. Por un lado la producción de vinos en España y su posterior exportación a la Colonia era un negocio importante y si se quiere hasta un arma estratégica; por otro lado, los canales de distribución tardaban muchos meses en abastecer las crecientes necesidades de la Nueva España y las rutas estaban sometidas a múltiples riesgos: hundimientos, pirataje, robos. Esto producía temporadas de absoluto desabasto. Se tienen documentados casos en Zacatecas en que el gobierno raciona el suministro de vino procedente de la metrópoli durante varios meses. En circunstancias como la anterior descrita, era normal que se solapase la producción de mezcal para hacer más llevaderas las soledades de unas tierras en ocasiones muy áridas, para alegrar un poco más la vida y, de paso, controlar el probable descontento de unos trabajadores que, especialmente en la minería y en la agricultura, se enfrentaban a arduas y extenuantes jornadas de trabajo.

Del desabasto se pasaba a la abundancia y con la abundancia los problemas eran otros. En esos momentos la actitud paternalista del poder de la época entraba de nuevo en funcionamiento y se volvían a establecer penas y castigos contra los que fabricaran mezcal, comerciaran con él, o lo consumieran en exceso. Se llegó incluso a amenazar con la excomunión a quienes infringieran las disposiciones, con lo que se consiguió que en una temporada el mezcal cambiara de nombre. Los consumidores divertidos no pedían mezcal sino que decían algo así: “sírreme una excomunión”, “ponme un litro de excomunión”. Las realidades y las costumbres de un pueblo son difíciles de abatir sólo con prohibiciones y reglamentos. Por otra parte, los gobiernos de la época ven rápidamente que una adecuada reglamentación en la producción de mezcal puede traer una importante riqueza a los impuestos.

A partir de mediados del siglo XVII la producción de mezcal se consolida y a pesar de algún intento transitorio de prohibición, se va expandiendo a lo largo del

siglo XVIII con sus altas y bajas, asociadas siempre a la historia del país. La Independencia, la guerra de Texas y la invasión estadounidense contribuyen a la revalorización de los productos nacionales. La posterior invasión francesa trae consigo un afrancesamiento de las clases dominantes del país, por lo que el mezcal queda relegado a las clases más populares. Este gusto por lo extranjero no desaparece con la restauración de la república, la cual contribuye, por un lado a la industrialización y por otro acentúa las contradicciones en el campo mexicano, llevando al sistema hacendario a su quiebra definitiva.

La revolución de 1910 transforma y regenera en buena medida, el agro mexicano, y la búsqueda de símbolos que afiancen la nacionalidad mexicana, se revalorizan los mezcales. La industrialización y las infraestructuras continúan su implantación. A partir de los años 30 del siglo XX las botellas comienzan a sustituir los envases a granel, facilitando su comercialización y preparando a la industria para el gran crecimiento que tuvo para la década siguiente, debido al desabasto que se produce en Estados Unidos debido a la Segunda Guerra Mundial. El éxito de algunos mezcales como el Tequila, que llega a convertirse en la bebida nacional, va abriendo camino a los demás mezcales. Y esto sea quizás una de las últimas paradojas del mezcal: el éxito del hijo está haciendo que el padre sea cada vez más conocido y apreciado.

El futuro del mezcal es promisorio; la aprobación de la denominación de origen para el estado de Zacatecas y la reciente creación del Consejo Regulador del Mezcal (COMERCAM, 2004.) para asegurar la aplicación de la Norma Oficial (NOM-070 SCFI-1994) que define de manera científica las características que debe cumplir la bebida, despejan en buena medida las discusiones sobre la calidad del mezcal, augurándole un porvenir de constante expansión (SEDEZAC, 2004).

1.3. Proceso de obtención del mezcal

Para tener un claro entendimiento en la elaboración de mezcal se visitaron algunas plantas productoras ubicadas en las dos regiones del estado (Fig. 1.1.): la empresa “Saldaña” ubicada en el municipio de Pinos, perteneciente a la región del estado sureste donde aún se produce mezcal a la manera tradicional, (también llamado artesanal) esto debido a que según palabras de los mismos productores “Esta técnica le proporciona el sabor característico al mezcal”; también, en esta región los agaves no son cultivados, sino que crecen de manera natural y son recolectados por los productores usada en las mezcaleras de la región al momento de la visita. Así como las empresas grupo “Escorpión” en el municipio de García de la Cadena y de Hacienda de Robles del municipio de Téul de González Ortega en la región sur del estado, donde el mezcal se obtiene a partir de un proceso industrial influenciado por las empresas tequileras del vecino estado de Jalisco.

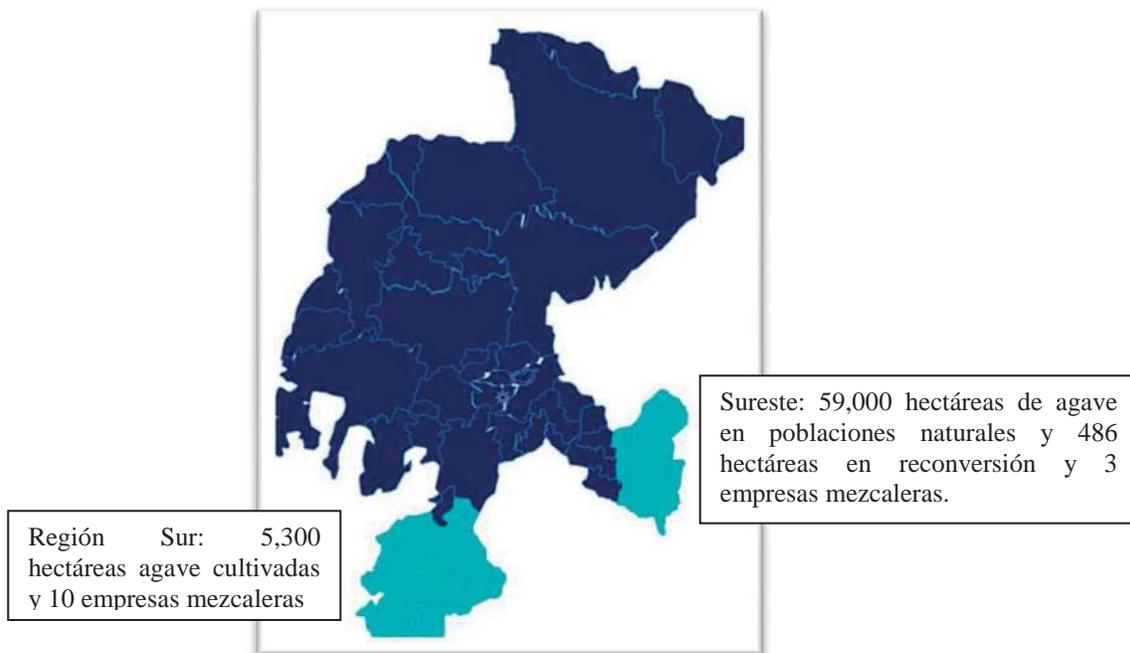


Fig. 1.1. Mapa de las regiones productoras de agave y mezcal en el estado de Zacatecas

Preparación del Terreno. Consiste en labores de desmonte o limpia, subsoleo, barbecho, rastreo, encalado y artelado o marcado. Su realización depende de las condiciones del terreno, el grado de mecanización, la capacidad económica y

el sistema de producción. Estas actividades se realizan solamente el primer año para el establecimiento de la plantación, y deben realizarse durante la temporada de frío para eliminar los huevecillos o insectos en estado larvario, disminuyendo la incidencia de plagas y enfermedades.

La preparación del terreno incluye el trazo de surcos y melgas, lo que influye directamente en la cantidad de plantas por hectárea. La melga puede ser ancha, con distancias entre melgas de 3 x 3 m y 1.30 x 1.30 m entre planta y planta, o angosta, de 1.50 x 1.50 m entre melgas y 0.80 x 0.80 m entre surco y surco (CIATEJ, 2004).

La tierra y su preparación influyen directamente en el desarrollo de las plantas. Las plantaciones difieren en tamaño por las características de plantación, básicamente si es de melga angosta o ancha. Esto únicamente se lleva a cabo en la región sur, donde actualmente existe una sobreproducción de agave, mientras que en el sureste la gran mayoría es población natural.

Plantación. El agave a diferencia de la mayoría de los cultivos, por tradición no se siembra, se planta, pues los productores no practican su reproducción a través de un método sexual, es decir, por semilla, porque se presentan demasiadas fallas en la germinación, es mayor la variabilidad y su ciclo se extiende.

El método seguido para la continuación del agave es asexual, técnicamente llamado apomixis, que consiste en la selección de rizomas y estolones. El agave puede producir rizomas desde el tercer año de vida, sin embargo, es hasta el cuarto año cuando éstos tienen la calidad suficiente para ser trasplantados, lo que se mide por el peso, que debe ser de 2 a 2.5 kg en promedio.

No se aconseja utilizar los rizomas de plantas que ya están próximas a ser cosechadas, es decir, de 6 años en adelante, pues al igual que los producidos en un inicio, tiene poca calidad para su reproducción, están más expuestos a ser afectados por plagas y enfermedades o por fenómenos climatológicos, entre otros.

Los primeros hijuelos se seleccionan cuando tienen el tamaño de una naranja o una toronja. Son sacados utilizando una barreta metálica y se mantiene al sol por diez días aproximadamente para que cicatricen las heridas provocadas por la extracción. Algunas personas los desinfectan para evitar la acción de patógenos.

Posteriormente se trasladan al sitio donde serán plantados y permanecerán hasta su madurez. Ese tamaño es el que, de acuerdo a la experiencia de los productores, le permite a la planta contar con el agua necesaria para sostenerse por sí misma durante la temporada de siembra y permite alcanzar 95 % de supervivencia en la plantación.

Aunque las plantas están expuestas a los efectos de las variaciones climáticas y la afección por agentes causales, la frecuencia nos indica que en una plantación es necesario realizar replante de 3 a 5%. Las plantas perdidas se deben reponer con elementos de la misma edad antes de que inicie el periodo de lluvias.

Para el establecimiento de viveros, se seleccionan plantas cuya piña es del tamaño de un limón, colocándolas a 10 cm de distancia entre cada una. Se hacen almácigos y al año se trasplantan a su sitio definitivo. El problema que se ha tenido con la planta producida en vivero, ha sido que casi el 50 % de la planta se pierde por diversos factores.

Esta actividad se realiza durante la temporada de secas, en Abril y Mayo. La densidad de la plantación depende del sistema de cultivo: Si es de melga ancha o de melga angosta, o si se está plantando en terrenos planos o con una pendiente pronunciada.

Utilizando una melga angosta en terreno plano se puede tener una densidad de plantación de 4,000 plantas/hectárea. La melga ancha puede tener una densidad

de 3,000 plantas/hectárea, pero en esta última, si es un terreno con pendiente pronunciada solamente se colocan 400 plantas (CIATEJ, 2004).

Trasplante. Los rizomas que se obtienen de plantas de agave en su tercer año de crecimiento, se dejan en un vivero para su desarrollo controlado, posteriormente, durante el temporal, cuando han alcanzado un peso aproximado de 750 gr, son llevados a las plantaciones comerciales, donde son plantados en hileras.

Cuando el agave es transplantado es necesario que el área alrededor de la planta se mantenga muy limpia, sin que la hierba le gane. Para ello algunas veces se aplican herbicidas que no le afecten o se realiza el deshierbe en forma manual (CIATEJ, 2004).

Fertilización. Puede o no fertilizarse, esto dependerá de las condiciones climáticas y el tipo de suelo; de ser necesaria la fertilización del suelo, se procede de la siguiente manera:

Cada año se fertiliza en tres ocasiones, dos de ellas con abono orgánico en temporada de sequía; y la tercera, en la temporada de lluvias aplicando agroquímicos. El abono orgánico se mide por paladas, y puede ser un cuarto, media palada o una completa, de cualquier modo es una medida. Cuando está seco se puede decir que pesa entre medio y un kilo por palada, siendo ésta la cantidad que se aplica en forma homogénea a todas las plantas y de todas las edades.

La fertilización con agroquímicos se realiza en forma manual, arrojando la dosis correspondiente a la base de la planta. La dosis varía en función de la clase de fertilizante que se aplique. Las dosis son variables, pues de este último se inicia con 80 gramos por planta y se va reduciendo de acuerdo con la edad, siendo la cantidad mínima 20 gramos (CIATEJ, 2004).

Poda o Barbeo. Los barbeos se practican en función de la edad del cultivo y las condiciones de la plantación. Cuando se lleva a cabo el arranque de hijuelos, con un cuchillo se elimina el ápice de las hojas de los rizomas, procurando que la herramienta siempre tenga buen filo para evitar mayores daños a la plántula que se trasplantará a otras áreas. Posteriormente se realiza la poda cuando la planta tiene entre 6 y 8 años de edad utilizando un machete especial de doble filo para eliminar el ápice de las hojas.

Esta labor promueve un mejor desarrollo del agave concentrando la mayor cantidad de azúcares en la piña, evita que ciertas plagas ovopositen y facilita las limpias. El barbeo puede ser floral suave o floral castigado, conocidos como barbeos de árbol, y el de escobeta. El de escobeta es aquel que se realiza cortando las pencas a la mitad dejándolas de tamaño uniforme. También se hace el tipo farol, que consiste en cortar la parte superior de las hojas, siendo mayor en las externas y va disminuyendo hacia las internas.

Otro tipo de barbeo es el conocido como cacheteo, que se practica con mayor frecuencia cuando se plantó en un sistema de melga angosta o la densidad de plantación es muy alta. Para ello se utiliza un machete eliminando las puntas de las hojas que cierran el paso sobre el área de tránsito (CIATEJ, 2004).

Desquiote. El desquiote consiste en cortar el escapo floral o quiote cuando alcanza una altura de 50cm. Con esta práctica llamada también capazón, se provoca que los azúcares de la planta se concentren en la piña. La planta permanece en reposo durante varios meses antes de su jima. Si no se efectúa el desquiote, la planta utiliza sus reservas en la formación del quiote y cuando éste florea la planta muere (CIATEJ, 2004).

La práctica del desquiote se lleva a cabo únicamente en la región sureste, ya que al haber una sobreproducción de agave en la región sur, al cumplir los 6 años se procede a su corte para conducirlo al proceso industrial.

Intercalado de cultivos. Sobre la conveniencia de asociar otros cultivos al del agave hay ideas encontradas. La mayoría de los productores opinan que introducir cultivos como el maíz en sus plantaciones, solamente crea una competencia por los nutrientes. Otros dicen que la fertilización que se realiza para el maíz, el cacahuate o el frijol, así como las medidas sanitarias aplicadas, le son útiles al agave, además de que permite obtener un ingreso adicional. En el caso que se decida intercalar cultivos, se tiene que llevar a cabo durante los primeros cuatro años de edad del agave, pues después ya no se puede realizar ninguna labor entre melgas (CIATEJ, 2004).

Características del suelo. Los mejores suelos son los arcillosos, permeables, abundantes en elementos derivados del basalto, ricos en hierro; que guarde la suficiente humedad en época de sequía. También es importante que los suelos tengan poco calcio, pues su presencia retarda la producción de azúcar (CIATEJ, 2004).

Las características anteriormente enunciadas corresponden a la región sur, ya que para la región sureste posee un suelo muy árido con respecto al sur, donde puede abundar el calcio en forma de piedra caliza, entre otras sales, poseen poca humedad durante todo el año a excepción de la temporada de lluvias.

Características del medio ambiente. El agave *Weberi cela* se desarrolla en sitios que no se encuentren expuestos a cambios bruscos de temperatura, con una media cercana a los 20°C. Las lluvias deben ser de aproximadamente 1 cm³ anual; la falta de agua provoca que la planta tarde más en madurar y, por el contrario, el exceso reduce el contenido de azúcares. La altitud media debe ser cercana a 1,500 m sobre el nivel del mar, y debe haber un cielo nublado entre 65 y 100 días al año.

Las heladas fuertes pueden ser muy perjudiciales para el desarrollo de las plantas jóvenes, incluso puede llegar a matar plantas adultas de 5 a 6 años. El agave

tiene la capacidad de tolerar ambientes extremos debido a que puede tomar dióxido de carbono durante la noche, por ser una planta de metabolismo ácido crasuláceo “CAM” (CIATEJ, 2004).

El agave *Salmiana* crece en altitudes que sobrepasan los 1800 m sobre el nivel del mar, en un clima seco extremoso, y dadas las condiciones del clima (inviernos rigurosos y veranos muy cálidos) el contenido de azúcares es muy bajo comparado con el agave *Weberi cela*.

Cosecha o Jima. La cosecha suele durar un periodo de cuatro años aproximadamente ya que el ciclo de cultivo varía en las diferentes regiones dentro de la plantación y dependiendo de la variedad de agave.

La cosecha del agave es la jima, durante este proceso se corta la planta y sus hojas para dejar al descubierto la cabeza, compuesta por el tallo y la vaina de las hojas. Primero se corta la planta al ras del suelo; una vez que la planta se derriba, se cortan las hojas. No existe una época determinada para esta labor, ya que durante todo el año se cosecha mezcal. Para esta tarea se utiliza la coa de jima, que es una herramienta circular de hierro de 15 a 20cm de diámetro, muy afilada y con un mango de madera.

Durante el primer año de cosecha se lleva a cabo el entre saque, mediante el cual se extrae entre un 15 % y un 20 % de la plantación. En el segundo y tercer año se jima gran parte de la plantación, que puede alcanzar un 65 % de la cosecha. Durante el último año se realiza el arrastre; aquí se extrae el restante de la plantación y se cosechan las plantas más viejas y de menor calidad (CIATEJ, 2004).

Transporte. Las piñas son acarreadas hasta el vehículo donde se acomodan sin importar su tamaño, pues son lo bastante grandes y resistentes como para soportar cualquier peso, y son llevadas a la industria productora de mezcal.

Para la industria es primordial que además de contar con un proveedor de agave que tenga el suficiente abasto, tenga un servicio eficiente de transporte, aunado a la accesibilidad de los caminos para tener la facilidad de extraer producto en cualquier temporada del año.

Por lo general en todas las huertas sazonas se jima constantemente, el problema durante la temporada de lluvias es su acceso. Una tonelada de agave dependerá del tamaño de las piñas; generalmente los productores tratan de homogenizar colocando piñas de aproximadamente el mismo tamaño.

Cocción. Después de la cosecha, se procede con la cocción. El cocimiento de las piñas en la región sureste se realiza en tradicionales hornos de mampostería, con leña para la cocción. El proceso tiene un tiempo de cocimiento que va de 48 a 72 horas, dependiendo de la temperatura de cocción. Por el contrario, en la región sur, el cocimiento se efectúa en autoclaves con inyección de vapor a presión con una duración de 8 a 12 horas de cocimiento.

A las piñas cocidas ya se le llama mezcal y pueden disfrutarse como un postre dulce. Las mieles que escurren durante el cocimiento se conocen como guishe. Éstas se recolectan y se terminan de cocer en una tina de cemento a la cual se le inyecta vapor mediante un serpentín de cobre. Posteriormente se mezclan con el resto de los mostos extraídos de las piñas cocidas y se fermentan.

La cocción tiene la finalidad de hidrolizar azúcares complejos como la inulina, que es una forma de almidón, en otros azúcares (como fructosa y sacarosa), cuya fermentación es más sencilla.

Molienda. Una vez finalizado el cocimiento de las piñas, éstas se parten generalmente de forma manual con un hacha. Los trozos se transportan a molinos. Los hay de diferentes variedades; el más usado es por tahona (usado en la región sureste, ya que en la región se usan los molinos de trapiche) que consiste en una

gran rueda de piedra de aproximadamente 4 ton de peso que antiguamente era movida por animales de tiro, hoy ha sido reemplazado por un vehículo de motor; la finalidad de esta etapa es separar los zumos o mieles del bagazo (residuo que queda después del proceso).

En el fondo del molino hay un canal subterráneo por donde se conduce el jugo hasta las tinas de fermentación. Las piñas semimachacadas se llevan a una tina construida a ras de suelo, para que varios operarios remuevan los trozos de mezcal con la finalidad de disolver la glucosa que queda en las fibras. Después de este proceso el bagazo pasa por una prensa o por un molino de rodillos impulsado por un motor de vapor, estas mieles se llevan por tuberías hasta las tinas de fermentación. El bagazo generalmente se destina como complemento alimenticio en las dietas de los animales vacunos de la zona.

Fermentación. El siguiente paso consiste en la fermentación, que es el proceso mediante el cual se transforman los azúcares de los mostos o mieles en alcohol etílico. Después, las mieles se recogen en tinas de madera. En el fondo de estos depósitos, hay una abertura por donde se descarga el líquido cuando ya está fermentado. Para la fermentación, se agrega a las mieles una porción de agua, esto se conoce como pie de fermento. Para la región del sureste el lapso de tiempo necesario para este procedimiento varía de acuerdo con la temperatura ambiental, la cual está ligada a la época del año, teniendo un tiempo de fermentación de 24 horas, llegando a durar hasta tres días. Mientras que para el sur la fermentación puede tardar un día o dos. Los productos generados durante el proceso son bióxido de carbono, agua, alcohol. Al comenzar la fermentación, el mosto es efervescente, pues las levaduras están transformando los azúcares en alcohol, toman oxígeno y liberan bióxido de carbono hasta el momento de haber transformado todos los azúcares contenidos en el mosto, la gran producción de dióxido de carbono y alcohol detienen la actividad de las levaduras, el movimiento efervescente cesa, dejando una espuma sobre la superficie del líquido fermentado; se dice que el mosto está muerto. En este momento los azúcares se han convertido en alcohol.

Destilación. El jugo ya fermentado pasa por un proceso de destilación por el cual al aplicar calor y presión, el agua y los alcoholes más volátiles se evaporan, dejando una solución de alcoholes más estables. Los fermentos se transportan al destilador mediante tuberías, donde se someten a altas temperaturas. Los vapores que se producen pasan por la columna o capitel, para después atravesar el serpentín, donde se enfrían y se vuelven líquidos. La destilación se efectúa en alambiques que pueden ser de acero inoxidable, o cobre.

Una vez finalizada la destilación se continúa con la homogenización del mezcal con el fin de conseguir un punto de graduación alcohólica idéntico. Al comienzo de la destilación el mezcal que se produce tiene una graduación superior para ir luego decayendo. A estos extremos del proceso se les conoce como destilados y residuos; “cabezas” y “colas”, respectivamente (CIATEJ, 2004).

Control de Calidad. El control de calidad se maneja por norma, misma que indica que se debe manejar una bitácora de entrada de agave que contenga el registro del predio, nombre del productor, etc. (NOM-070-SCFI-1994).

La única limitante que puede existir para recibir la piña de agave por la industria es el contenido de azúcar, que debe ser lo más alto posible. Una cantidad normal es de 25 % del peso de la piña en azúcares reductores totales, pero se encuentran agaves conteniendo desde 27 %. Por lo general durante la temporada de lluvias, el contenido de azúcares se reduce ya que el agua los diluye, aunque la diferencia no es muy grande (CIATEJ, 2004).

Cabe destacar que el control de la calidad se lleva únicamente en la región sur, ya que los productores del sureste no están interesados en certificar su mezcal como lo establece la NOM-070.

2. ANTECEDENTES

2.1. La inulina

La inulina, es un carbohidrato de reserva presente en determinadas familias de mono y dicotiledóneas como Liliáceas, Amarilidáceas, Gramíneas y Compuestas. Se encuentra en cantidades significativas en vegetales usados habitualmente para el consumo humano como: trigo, banana, achicoria, alcachofa, espárrago, puerro, cebolla y ajo. De hecho, se ha estimado que los americanos consumen una media de 1-4 gramos diarios de inulina y los europeos de 3-11 gramos diarios (www.wikipedia.org/wiki/Inulina).

Su estructura química es de un polisacárido heterocíclico con una *D*-glucopiranososa o *D*-fructopiranososa (anillo de 6 carbonos) y de una cadena lineal compuesta de varias unidades de *D*-fructosa (anillo de 5 carbonos) unidos por enlaces β -(2,1) (Fig. 2.1.). La longitud de la cadena polimérica puede variar de 20 a 200 monómeros de fructosa, dependiendo el grado medio de polimerización de la fuente de donde se obtiene, siendo para el caso de los agaves de de 30 a 35 unidades de *D*-fructosa.

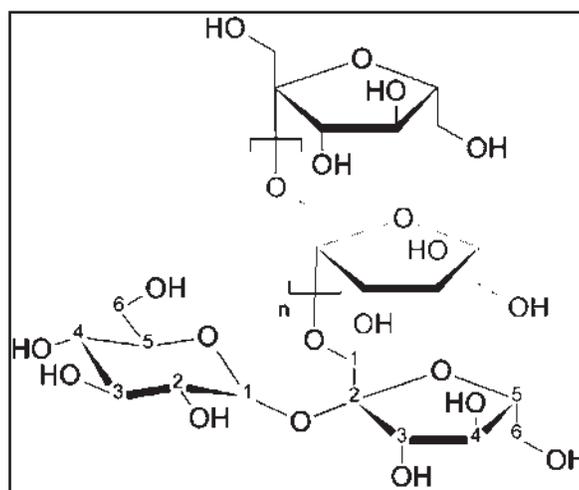


Fig. 2.1. Estructura base de la inulina.

2.1.1. Aplicaciones de las inulinas.

Usos industriales

La inulina, tal como se obtiene de las plantas que la contienen, puede ser directamente convertida en etanol, por medio de una sacarificación y fermentación microbiológica simultánea.[18] Esta técnica es la base para la obtención de las bebidas alcohólicas mezcal y tequila, pero también posee un enorme potencial para convertir residuos de cosecha de alta inulina en etanol para ser utilizado como combustible. (www.wikipedia.org/wiki/Inulina)

Usos alimentarios.

La inulina se está utilizando de manera creciente en el procesado de alimentos, debido a sus inusuales características nutricionales y, en especial, a sus propiedades como ingrediente alimentario. Propiedades que van desde un sabor moderadamente dulce en los miembros más sencillos de la familia, hasta los más complejos que pueden servir como sucedáneos de harinas; pasando por una enorme cantidad de compuestos de mediana complejidad sin sabor y con una textura y palatabilidad muy similar a la de las grasas. Además de estas propiedades, es interesante destacar que la metabolización de la inulina aporta 1,5 kcal /g. Por todo ello, en numerosos productos, en especial lácteos y helados, la inulina se usa para reemplazar a las grasas. (www.wikipedia.org/wiki/Inulina)

Usos médicos.

En cuanto a los potenciales usos terapéuticos, ya se ha indicado que favorece la absorción de calcio por lo que tiene virtual interés en el mantenimiento de la salud ósea. Otras aplicaciones que se han propuesto es usarla, sola o en combinación con bacterias probióticas, en los tratamientos de la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), de la hipercolesterolemia o del estreñimiento. (www.wikipedia.org/wiki/Inulina)

2.2. Los Azúcares reductores

Los azúcares que contienen en su estructura grupos aldehídicos o cetónicos libres reaccionan como agentes reductores débiles y se llaman azúcares reductores. Estos incluyen a todos los monosacáridos y los disacáridos maltosa, lactosa y celobiosa (Miller, 2001).

Estas propiedades de los azúcares se usan para cuantificar estos mismos por la reducción de Cu (II) a Cu (I). El licor de Fehling consiste en tartrato cúprico alcalino y se convierte en óxido cuproso insoluble al calentarse en ebullición con una solución del azúcar reductor; esto constituye la base de varios procedimientos. En el método de Munson y Walker, el óxido cuproso se separa por filtración y se pesa. En el método de Lane y Eynon, a la reacción le sigue una titulación usando un indicador redox. El método de Luff-Schoorl usa un reactivo alcalino que contiene citrato cúprico, después de calentar a ebullición con una solución que contiene azúcares reductores, se añade yoduro de potasio y ácido después de enfriar; el yodo liberado que es equivalente al cobre no reducido, se titula con tiosulfato de sodio. El método semi-micro de Somogy utiliza el reactivo de tartrato alcalino de cobre y yodato de potasio para reaccionar en caliente con el azúcar reductor; el exceso de yodato se cuantifica yodométricamente con tiosulfato de sodio después de la adición de yoduro de potasio y ácido sulfúrico diluido. De manera alternativa el cobre no reducido puede determinarse colorimétricamente (Kirka, 2000).

La importancia de los azúcares reductores en la industria mezcalera radica en que al ser monosacáridos provenientes de la inulina que previamente fue hidrolizada por vapor durante la etapa de cocimiento en hornos o autoclaves, son el sustrato para que las levaduras efectúen la fermentación de estos para la producción del mezcal. La determinación precisa de los azúcares reductores fermentables nos indica cuanta cantidad de alcohol podremos obtener a partir de la cantidad exacta de azúcares fermentables; también para la formulación de los mostos de fermentación, ya que a mostos con un valor mayor a 18 °Brix la levadura no fermenta, esto es, se

inhibe la fermentación; mientras que un mosto de 13 - 18 °Brix es difícil llevar un control adecuado de la fermentación. Finalmente cuando se quiere conocer el momento en que la fermentación ha llegado a su fin y detener el proceso antes de que continúe a producción de ácido acético, también es necesario saber qué cantidad de azúcares reductores aún están presentes en el mosto, que en este caso se espera encontrar 1°Brix o menos de este, como indicativo de que la fermentación alcohólica ha llegado a su fin (CIATEJ, 2004).

Por otro lado, la medición de los azúcares reductores hoy en día en la industria mezcalera se lleva a cabo por el método de Lane – Eynon, que está avalado por el Consejo Mexicano para la Regulación de la Calidad del Mezcal (COMERCAM, 2004.) como su método oficial, además de ser la única manera de medir los azúcares reductores totales (ART's) en el proceso de elaboración de mezcal, este método tiene ciertos inconvenientes al ejecutarse, arriesgando incluso la integridad del analista que hace las pruebas a las muestras. Motivo por el cual es necesario buscar otras alternativas de métodos que permitan medir los azúcares reductores con los mismos resultados, pero que sean más rápidos y seguros en su ejecución.

2.3. Levaduras

El alcohol lo conoce la humanidad desde hace muchos siglos; su origen fue la fermentación natural de los azúcares para la producción de bebidas y licores. Esto se logró sin tener idea de la existencia de los microorganismos, ni de la importante función que desempeñan.

El descubrimiento de los microorganismos se asocia con el desarrollo del microscopio en el siglo XVII. A Partir de entonces se comenzó el estudio de los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), elementos clave de los procesos fermentativos. En 1863, Louis Pasteur demostró mediante estudios del vino y la

cerveza que las levaduras son las responsables de la biotransformación de los azúcares (principalmente fructosa y glucosa) en alcohol y dióxido de carbono.

El grupo de microorganismos conocidos como levaduras se clasifican dentro del reino *Fungi* (hongos). Una levadura se define como un hongo basidiomiceto o ascomiceto que se multiplica de manera vegetativa, por gemación o fisión principalmente. Comparadas con otro tipo de microorganismos como bacterias, algas y protozoarios, presentan pocos géneros y especies. Los dos Principales géneros de levaduras de interés comercial son *Candida* y *Saccharomyces*.

2.3.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica clásica, toma en cuenta los siguientes criterios:

Morfológicos: reproducción vegetativa (gemación o bipartición), reproducción sexual (zigoto, esporas), morfología celular en medio sólido y líquido, aspecto de la colonia, formación de pseudomicelio, velo, entre otros.

Fisiológicos: fermentación y asimilación de azúcares, desarrollo en presencia de etanol, poder fermentativo, asimilación de ácidos orgánicos, escisión de arbutina, asimilación de nitratos, necesidades en vitaminas, crecimiento a diferentes temperaturas, fenotipo Killer.

El objetivo de esta clasificación es la identificación de las levaduras hasta el nivel de especie; además considera diferentes niveles de jerarquía. En la tabla 2.1 se presenta el ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 2.1. Ejemplo de jerarquía en la clasificación de las levaduras.

Categoría taxonómica	Ejemplo
Subdivisión	<i>Ascomycotina</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Subfamilia	<i>Saccharomycetoideae</i>
Género	Saccharomyces
Especie	Cerevisiae

2.4. Enzimas

Una enzima es un catalizador biológico que acelera la velocidad de las reacciones bioquímicas con un elevado grado de especificidad, además de requerir temperatura, pH, presión moderados; en su ausencia la mayoría de las transformaciones químicas requeridas para mantener activas a las células, tardarían mucho tiempo en efectuarse. Con base a estas características, las enzimas, se han aplicado a procesos biotecnológicos que han venido a impulsar a la industria farmacéutica para la obtención de vitaminas, antibióticos, en análisis clínicos (diagnóstico); para curtir cuero, se han usado en síntesis orgánicas, en la industria textil; en industria de alimentos para la obtención de jarabes glucosados y fructosados, producción de aromas, sabores y manufactura de queso entre otros.

En la naturaleza, la biomasa vegetal es una fuente renovable, que está constituida principalmente de celulosa, hemicelulosa (xilanos, mananos, galactanos, etc.), pectina y lignina entre otros. Estos polisacáridos están contenidos en gran número en los desechos generados de las actividades agrícolas e industriales como: la tala de árboles, obtención de celulosa y papel, recolección de granos, cultivo de caña de azúcar, de sorgo, de cítricos, así como en desperdicios de origen urbano (papel, cartón, etc.).

En la actualidad existe gran interés en el aprovechamiento biotecnológico de subproductos agroindustriales, ya que se producen grandes volúmenes que

normalmente son considerados como desperdicio. Éstos, pueden servir para resolver problemas de escasez de alimentos y energéticos, disminuir la contaminación del medio ambiente y simultáneamente obtenerse biomasa y enzimas.

En nuestro país existen diferentes desechos lignocelulósicos como: la paja de frijol, el bagacillo de caña de azúcar, la cáscara de limón, de naranja, pulpa de henequén y la remolacha, los cuales constituyen un vasto recurso natural renovable, que debido a su composición química, abundancia y biodisponibilidad pueden ser utilizados como materia prima en diferentes procesos biotecnológicos.

Por ello, se han venido desarrollando proyectos de investigación enfocados a la utilización de estos desechos lignocelulósicos, en fermentaciones para la producción de enzimas microbianas de uso industrial. Ya que estos subproductos pueden ser convertidos a azúcares solubles por medio de una sacarificación enzimática o pueden ser utilizados para la producción de enzimas, tales como las celulasas, pectinasas y hemicelulasas, que son importantes en la industria.

Además, estas enzimas tienen importancia biológica, ya que participan en conjunto en la reincorporación del CO₂ a la atmósfera (ciclo del carbono), el cual es posteriormente fijado por las plantas durante la fotosíntesis. Estas enzimas además juegan un papel fisiológico importante en los tejidos de las plantas, ya que intervienen en la maduración, en la patogénesis de las mismas, así como en la excisión de las hojas en los árboles.

Por otro lado, la efectiva hidrólisis de los sustratos lignocelulósicos depende de la naturaleza de éstos, los cuáles son generalmente heteropolímeros que varían según la fuente de donde provengan y también dependen del sistema de enzimas, el cual debe presentar al menos de dos a cuatro tipos de actividades.

El uso de enzimas microbianas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos presenta ventajas, debido a la especificidad de las enzimas que participan en las

reacciones químicas en condiciones relativamente suaves de temperatura, pH y presión; y a la no-pérdida del sustrato debido a la generación de subproductos indeseables por las modificaciones químicas que causan los catalizadores químicos, en particular los ácidos y álcalis.

Por otra parte, en México y en muchos países, a pesar de los altos volúmenes de algunos materiales lignocelulósicos que existen, aún no se producen éstas enzimas a gran escala. Por lo que éstos materiales, resultarían ser un buen sustrato para la producción de estas enzimas con potencial biotecnológico práctico, ya que son un abundante recurso natural renovable y barato.

Nuestro país ocupa el segundo lugar en la producción de limón a nivel mundial, y en particular, la cáscara de limón tiene un alto contenido de pectina y es un sustrato potencial, para la producción de pectinasas, enzimas de amplia utilización en la industria de la extracción y clarificación de jugos vegetales.

Otro de los restos lignocelulósicos más abundantes es el bagacillo de caña de azúcar, que contiene un 30% de hemicelulosa (90% de ella en forma de xilanos) y del cual se producen 12 millones de toneladas al año, por lo que somos el sexto productor en el mundo. Siendo los xilanos un sustrato potencial para la producción de xilanasas, enzimas que tienen varias aplicaciones prácticas, principalmente en algunos procesos para el blanqueado de la pulpa de celulosa, donde su utilización puede llegar a reemplazar a agentes químicos dañinos, lo que implica importantes beneficios desde el punto de vista económico y ambiental. También otro desecho abundante, es la paja de frijol, del cual se pueden obtener principalmente celulasas, muy empleadas para hacer protoplastos entre otros muchos usos. De ahí la importancia de buscar alternativas para aprovechar al máximo éstos subproductos. Recientemente la industria mezcalera de nuestro país, arroja toneladas de bagazo del agave que son fuente rica también en celulosa, xilanos y pectina.

Tradicionalmente las enzimas de uso práctico se han extraído a partir de vegetales y animales, pero actualmente se ha preferido el uso de microorganismos, porque es más fácil manejar la producción de enzimas mediante la estandarización de condiciones de cultivo, como pH, temperatura, concentración de nutrientes, etc. que nos lleva a aumentar los rendimientos en la producción de una enzima específica.

En la actualidad se tiene el interés en proyectos de investigación enfocados al desarrollo de procesos biotecnológicos empleando microorganismos aislados de zonas donde se producen éstos materiales lignocelulósicos, de tal forma que estos microorganismos estén adaptados para utilizar eficientemente estos desechos como sustrato de fermentación, para la producción de enzimas extracelulares de interés.

Para ello a continuación se describen aquellas enzimas que se producen en mayor cantidad en la producción de mezcal y que están involucradas en la degradación de los bagazos y azúcares del agave en la fermentación.

2.4.1. Inulinasas

Las inulinasas son β -fructosidasas no específicas que hidrolizan inulina en fructooligosacáridos (FOS) y fructuosa pura con algo de glucosa. La inulina aparece de forma natural en una variedad de plantas como la dalia, el diente de león, la achioria, el *Jerusalem artiochoke*, etc., disponibles en grandes cantidades (Elyachioui y col., 1992; Onodera y Shiomi, 1992; Cho y Yun, 2002). La inulina y sus análogos son polifructosas que se componen de moléculas de fructosa unidas por enlaces β (2-1) y al final de la cadena una molécula de glucosa unida a la fructosa por (1-2) como sacarosa (Edelman y Jefford, 1964; Derycke y Vandamme, 1984; Gupta y col., 1990).

2.4.1.1. Aplicaciones de inulinasas

Los jarabes de fructosa tienen un uso muy amplio como edulcorantes nutritivos en la industria de los alimentos, en especial en bebidas suaves, postres, panificación y plantas conservadoras de frutas (Flores, 1995).

La obtención de fructosa a partir de inulina se lleva a cabo mediante una reacción enzimática simple con inulinasas que producen un 95% de fructosa (Gupta y Kaur, 1992; Gupta y col., 1994; Pessoni y col., 1999). En cambio, la elaboración a partir de almidón, necesita tres pasos enzimáticos (α -amilasa, amilo-glucosidasa y glucosa isomerasa) para alcanzar una concentración al 45% en fructosa (Carasik y Carroll, 1983).

La aplicación de diseños factoriales ha dado buenos resultados para la optimización de procesos fermentativos y son cada vez más usados, particularmente en la producción de inulinasas porque permiten estudiar varios factores al mismo tiempo y sus posibles interacciones. (Kalil y col., 1999; Vranesic y col., 2002; Skowronek y Fiedurek, 2004).

Es el objetivo en la actualidad es el estudio de la producción de inulinasas cultivadas en lote donde se usa un cepa de *Saccharomyces sp.* y polifruktosas de *Agave tequilana Weber* variedad azul como fuente de carbono (tradicionalmente aprovechado para la producción de mezcal en el estado de Zacatecas).

2.4.2. Celulasas

Las enzimas celulolíticas son producidas por bacterias, hongos y levaduras. Las enzimas actúan sobre sustratos insolubles, tales como la celulosa y deben de ser extracelulares. El sistema de enzimas celulolíticas está compuesto de 3 tipos de actividades: actividad de *celobiohidrolasa* (CBH), actividad de endo- β -glucanasa (EG), y actividad de β -glucosidasa. Estas actividades siempre actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa. Se ha propuesto una hipótesis que explica la acción sinérgica entre las diferentes actividades enzimáticas. Cada

actividad consiste de algunas enzimas. Las *celobiohidrolasas* I y II hidrolizan celulosa insoluble en *celodextrinas* y *celobiosa*. Las *endoglucanasas* I y II actúan sobre las *celodextrinas* y las hidrolizan en unidades de *celobiosa*. La *celobiosa* es entonces cortada en dos unidades de glucosa por la β -*glucosidasa*. A menos que se purifiquen, es difícil determinar entonces la actividad individual de las enzimas celulolíticas debido a la acción sinérgica entre las enzimas. Hasta ahora, el ensayo más usado para poder comparar los sistemas de enzimas celulolíticos es el ensayo del papel filtro (Mandels, 1976; Montenecourt y col., 1978), en el cual es medida la hidrólisis de un pedazo definido de papel filtro. Sin embargo, este ensayo no muestra en realidad la verdadera capacidad hidrolizante del sistema de enzimas celulolíticas, ya que dicha actividad es dependiente del sustrato. En las bacterias celulolíticas se incluyen especies aeróbicas tales como *Pseudomonas* y *Actinomicetos*, anaerobios facultativos como *Bacillus* y *Cellulomonas* y anaerobios estrictos como *Clostridium*. Comparadas con los hongos, las bacterias celulolíticas producen bajos rendimientos de *enzimas* celulolíticas. Los mejores productores de enzimas entre las bacterias son los miembros de los géneros *Clostridium*. La producción de enzimas celulolíticas entre los hongos es extensa, incluye las especies de *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillum* y *Phanerochaete chrysosporium*. Los hongos productores de enzimas celulolíticas más extensamente estudiados en la actualidad son los de las especies *Trichoderma*. Esto es debido al exitoso desarrollo de las cepas mutantes *T. reesei* QM9414 y Rut C30, ambas originadas de *T. reesei* QM6 aislada en Massachusetts por el comando de investigación y desarrollo Natick, de la armada de los Estados Unidos (Mandels, 1976). El interés corriente en las especies de *Trichoderma* no excluye la posible importancia futura de otros hongos productores de enzimas celulolíticas, como por ejemplo las especies de *Penicillium* y de las levaduras del género *Saccharomyces*.

2.4.2.1. Aplicaciones de celulasas

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado (biostoningbiobleaching). Tradicionalmente el

desteñido de este tipo de prendas se efectuaba con piedra pómez (*stone wash*). Una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas, menos desgaste de las lavadoras y menos polvo de piedra pómez en el ambiente de la lavandería. El biostoning ha abierto nuevas posibilidades en el acabado de tela vaquera, aumentando la variedad de tratamientos de acabado. También se incrementa la productividad del proceso de deslavado, ya que las lavadoras contienen menos piedras y más prendas. Por otro lado, las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Asimismo se usan en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes.

2.4.3. Xilanasas

Debido a la diversidad, complejidad y abundancia de los xilanos, son necesarias las enzimas xilanólíticas para su degradación, que además tienen importancia biológica porque participan en conjunto con otras enzimas en la reincorporación del CO₂ al ciclo del carbono, el cual es fijado por las plantas durante la fotosíntesis y posteriormente liberado a la atmósfera a través de la acción microbiana sobre los residuos de vegetales (Coughlan y Hazlewood, 1993). Estas enzimas, además juegan un papel fisiológico importante en los tejidos de las plantas, ya que intervienen en la maduración y en la patogénesis de las mismas así como en la escisión de las hojas en los árboles (Biely, 1992). También son de importancia en la flora microbiana del rumen para la digestión (Pettipher y Latham, 1979), y así mismo, hay interés en relación al uso de estas enzimas en la sacarificación de la biomasa vegetal ó en aplicaciones biotecnológicas relacionadas, ya que el uso de enzimas microbianas que degradan materiales lignocelulósicos, presentan ventajas,

porque no contaminan y porque poseen un requerimiento bajo de energía, y debido a la especificidad de las enzimas que participan en las reacciones químicas relativamente suaves de temperatura, pH y presión, y a la no pérdida del sustrato debido a la generación de subproductos indeseables por las modificaciones químicas que causan los catalizadores químicos, en particular los ácidos y álcalis, que además presentan velocidades lentas de hidrólisis (Wong, 1988).

El sistema xilanolítico, es un sistema complejo formado por varios tipos de enzimas como las *xilanasas* y las enzimas accesorias, que cooperan en conjunto para la degradación de los xilanos presentes en las hemicelulosas de las plantas (Biely, 1985). Dentro de este sistema xilanolítico, las *xilanasas* son las más importantes, porque actúan rompiendo los enlaces β -(1, 4)-glicosídicos sobre la cadena principal del xilano y ellas se clasifican según su modo de acción en endo-*xilanasas* y β -*xilosidasas* (Fig. 2.3). Las Endo-*xilanasas* [β -(1, 4)-D-*Xilan Xilanohidrolasa* (EC 3.2.1.8)], atacan uniones internas β -(1, 4) de los xilanos, produciendo xilo-oligosacáridos de varios tamaños, siendo esta actividad la más importante para la degradación del xilano. Además, estas no cortan al azar, ya que el lugar de rompimiento está determinado por el tamaño del sustrato y por la presencia

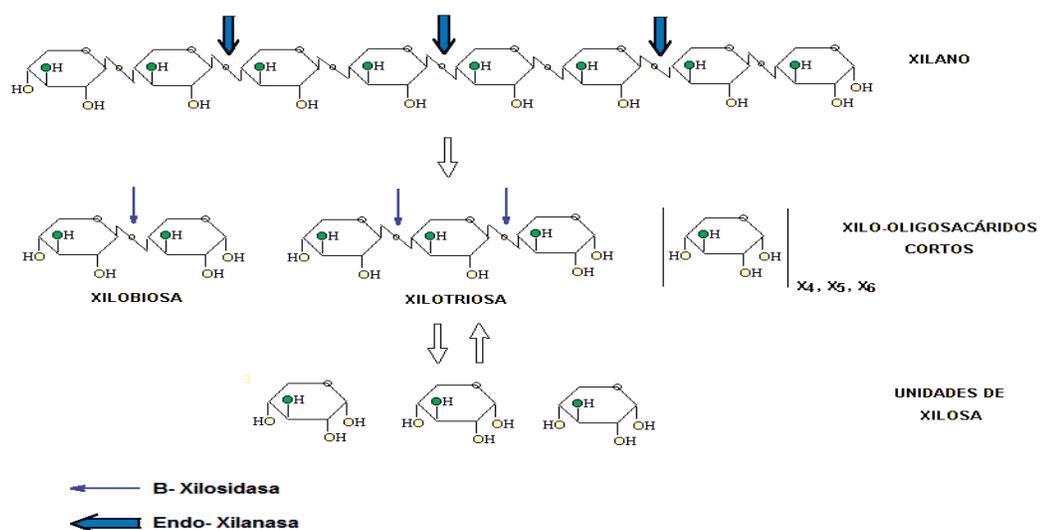


Fig.2.3. Sitios de acción de la xilanasas involucradas en la hidrólisis del esqueleto principal del xilano. X₄, Xilotetrosa; X₅, Xilopentosa y X₆, Xilohexosa.

de sustituyentes. Y la β -xilosidasa [β -(1, 4)-D-Xilósido Xilohidrolasa (EC 3.2.1.37)] que actúa preferencialmente sobre el disacárido y xilo-oligosacáridos cortos, produciendo principalmente monómeros de xilosa, además en algunos microorganismos estas enzimas presentan actividad de *transferasa* (Drouet, 1994).

2.4.3.1. Aplicaciones de xilanasas

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo Kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se hacía por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternos de estos compuestos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos. En los últimos diez años, la industria de la pulpa y el papel utiliza mezclas de xilanasas en el proceso de bioblanqueo, con esto se ha logrado realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo, además de resultar muy efectivas con respecto a los costos. Hoy en día, un número significativo de fábricas en todo el mundo utilizan el proceso completo de blanqueo con xilanasas. Además, diferentes productos, incluyendo papeles para revistas y papeles con determinado tejido que son manufacturados con pulpas tratadas enzimáticamente, han sido introducidos al mercado con éxito. Cabe señalar que es indispensable que la preparación de xilanasas esté completamente libre de celulasas, ya que esto traería serias implicaciones económicas en términos de pérdida de celulosa, calidad de la pulpa degradada y un incremento en los costos del tratamiento de efluentes. Las xilanasas, como las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la panificación, entre otras.

2.4.4. Pectinasas

Al grupo complejo de enzimas que degradan las sustancias pécticas, se les denominan *Pectinasas* y se dividen en dos subgrupos, las *pectinesterasas* y las *despolimerasas*. Las *pectinesterasas* (PE) actúan removiendo los grupos metoxilo presentes en el carboxilo del ácido galacturónico, dando como producto final el ácido poligalacturónico y metanol. Las *despolimerasas* rompen los enlaces glicosídicos alfa 1-4 de la cadena principal actuando en dos formas: a) por hidrólisis incorporando una molécula de agua a la pectina (*Polimetilgalacturonasa*, PMG) o al ácido poligalacturónico (*Poligalacturonasa*, PG) y b) por beta-eliminación formando un doble enlace entre los átomos del carbono 4 y 5 del galacturonato presente en la molécula de pectina (*Polimetilgalacturonato Liasa*, PMGL) o en el ácido poligalacturónico (*Poligalacturonato Liasa*, PGL). Además éstas enzimas se clasifican de acuerdo a su sitio de acción, cuando actúan sobre el extremo no reductor de la molécula se denominan de tipo "exo" y cuando actúan aleatoriamente dentro de la molécula polimérica se denominan de tipo "endo" (Sakai, 1992; Whitaker, 1994). Las *pectinasas* con actividad endo son las enzimas de mayor importancia en la industria alimenticia.

Las *pectinasas* son generalmente enzimas extracelulares e inducibles, es necesario para su producción la adición al medio de pectina o de algún sustrato que la contenga. Algunas de estas enzimas pueden ser producidas constitutivamente y también algunas son sensibles a represión catabólica (Aguilar y Huitrón, 1990; Maldonado y col., 1989).

Las *pectinasas* son producidas por las plantas y una gran variedad de microorganismos como las bacterias, las levaduras y los hongos filamentosos. Cada uno de estos organismos puede producir diferentes *pectinasas*, pero no se ha encontrado en la naturaleza que un mismo organismo produzca todas las actividades pectinolíticas que se han reportado. La mayoría de las *pectinasas* estudiadas son producidas por bacterias y hongos, *Erwinia* y *Aspergillus* principalmente. La

producción comercial de *pectinasas* se lleva a cabo esencialmente con especies del género *Aspergillus* siendo *Aspergillus niger* uno de los organismos más utilizados.

Debido a que estas enzimas actúan sobre el sustrato generando productos que van a ser utilizados por otras enzimas pectinolíticas del mismo sistema y debido a que actualmente no están disponibles todos los sustratos para medir en forma individual a cada una de las enzimas que lo componen, ha sido difícil la caracterización molecular y cinética de los componentes del sistema pectinolítico presentes en los extractos crudos. Además se ha encontrado la presencia de una actividad enzimática en diferentes especies moleculares (isoenzimas) que tienen además propiedades parecidas, lo cual complica aún más el estudio de cada una de las enzimas y hasta ahora no se sabe por qué los microorganismos las producen y que ventajas tienen para ellos. (McMillan y col., 1992; Johnston y Williamson, 1992; Manachini y col., 1987).

2.4.4.1. Aplicaciones de pectinasas

Entre las actividades pectinolíticas más estudiadas se encuentran las enzimas con actividad endo, los cuales rompen aleatoriamente enlaces glicosídicos de pectina o pectato. El interés por estudiar estas enzimas radica en la importancia en su aplicación en la industria alimenticia en procesos de elaboración, de transformación y de extracción de alimentos de origen vegetal. Así mismo por su participación en la maduración y conservación de frutas y vegetales y por el papel que juegan como factores de virulencia de fitopatógenos. Sin embargo aún faltan muchos estudios en los organismos ya mencionados y en otros que permitan un mayor conocimiento de las propiedades cinéticas y de acción catalítica de cada uno de los componentes enzimáticos pectinolíticos, con el fin de entender los mecanismos de acción concertada y los mecanismos regulatorios de un solo componente, que puedan conducir a un mejor conocimiento de este sistema multienzimático, y también que permitan eventualmente una mejor aplicación práctica.

Las *pectinasas* son importantes desde el punto de vista biológico por su intervención en la degradación de biomasa vegetal, la cual contiene sustancias pécticas, así éstas enzimas participan en el reciclamiento del carbono y contribuyen a evitar la acumulación de este material orgánico. Además interviene en la patogénesis de las plantas en donde actúan como factores de virulencia, en los procesos de maduración de frutas y vegetales, así mismo están involucradas en los procesos de germinación y en la caída de las hojas.

Desde el punto de vista práctico, las *pectinasas* son importantes por su capacidad de disminuir la viscosidad de los jugos de frutas. En la industria, al utilizar *pectinasas* en los procesos de extracción y clarificación de jugos de frutas hay un incremento en la extracción de jugo, disminuyen los problemas de filtración y el costo de elaboración. Además con las *pectinasas* se logra una mejor clarificación y brillantez, el mejoramiento del bouquet y del sabor de los vinos, aumentan la estabilidad del producto final y mejoran la extracción de los pigmentos que dan color. En los jugos despectinazados que se destinan a la elaboración de productos fermentados (vinos, sidras, etc.), se observa una reducción en el tiempo de fermentación y un aumento en el grado alcohólico final. Las *pectinasas* también son de interés en la maceración de vegetales y frutas y extracción de aceites de olivo (Sakai, 1992; Fogarty y Kelly, 1983; Voragen y Pilnik, 1995).

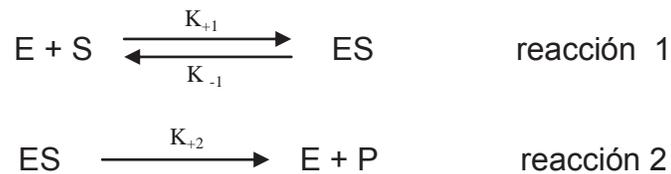
2.5. Cinética enzimática

2.5.1. Cinética de las reacciones catalizadas por las enzimas. Ecuación de Michaelis-Menten

Los principios generales de la cinética de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas, pero estas muestran también un rasgo característico, que no se observa en las reacciones no enzimáticas: la saturación con el sustrato. Todas las enzimas muestran el efecto de

saturación, pero varían ampliamente con respecto a la concentración de sustrato que se necesita para que se manifieste.

L. Michaelis y M. L. Menten desarrollaron en 1913 una teoría general acerca de la acción y cinética de las enzimas. Esta teoría, que es fundamental para el análisis cuantitativo de todos los aspectos de la cinética de las enzimas y de la inhibición, se ha desarrollado plenamente para el caso sencillo de una reacción en la que solo hay un sustrato. La teoría de Michaelis-Menten supone que la enzima E se combina en primer lugar con el sustrato S para formar el complejo enzima-sustrato ES; a continuación este último se escinde en una segunda etapa, para formar enzima libre y producto P:



Deduciremos a continuación la ecuación de Michaelis-Menten, que expresa la relación matemática entre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima, la concentración del sustrato y ciertas características de la enzima. La ecuación de Michaelis-Menten es la ecuación de la velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas que actúan sobre un sustrato. En la deducción, debida a Briggs y Haldane:

[E]: representa la concentración de la enzima libre

[ES]: la concentración del complejo enzima-sustrato

[E_T]: la concentración total de la enzima (suma de las formas libre y combinada).

[S]: la concentración del sustrato, la cual se supone mayor a [E].

El objeto de esta deducción es definir una expresión general para v_0 , que es la velocidad inicial de una reacción catalizada enzimáticamente, suponiendo que las reacciones de esta clase transcurren en dos etapas, tal como muestran las

reacciones 1 y 2. La velocidad inicial es igual a la velocidad de ruptura del complejo [ES], de acuerdo con la reacción 2; podemos escribir para ella la ecuación de velocidad de primer orden:

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad \text{Ec. (2.1)}$$

Sin embargo, ya que ni k_{+2} , ni [ES], pueden determinarse directamente, debemos encontrar otra expresión para v_0 en función de otras variables que puedan medirse con más facilidad. Para ello escribiremos en primer lugar la ecuación de la velocidad de segundo orden para la formación de ES a partir de E y S:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[[E_T] - [ES]][S] \quad \text{Ec. (2.2)}$$

A continuación escribiremos la ecuación de velocidad para la descomposición de ES por suma de dos reacciones; en primer lugar, la ecuación de la reacción inversa 1 y ecuación de la reacción 2, tendremos entonces:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad \text{Ec. (2.3)}$$

Cuando la velocidad de formación de ES es igual a su velocidad de desaparición, es decir, cuando el sistema ha alcanzado el estado estacionario, que se define como aquel en que la concentración de ES permanece constante, entonces:

$$k_{+1}[[E_T] - [ES]][S] = k_{-1}[ES] + k_{+2}[ES] \quad \text{Ec. (2.4)}$$

Reordenando la ecuación anterior, obtenemos:

$$\frac{[S][[E_T] - [ES]]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M \quad \text{Ec. (2.5)}$$

La constante K_M , que sustituye el término $(k_{-1} + k_{+2})/(k_{+1})$, se llama constante de Michaelis Menten. A partir de esta ecuación puede obtenerse la concentración del complejo ES en el estado estacionario, despejando dicho término.

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. (2.6)}$$

Ya hemos visto que la velocidad inicial de reacción, v_0 , de una reacción enzimática es:

$$v_0 = k_{+2}[ES] \quad \text{Ec. (2.1)}$$

Podemos sustituir, ahora, el término [ES], que figura en la ecuación (2.1), por su valor en la ecuación (2.6):

$$v_0 = k_{+2} \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. (2.7)}$$

Cuando la concentración del sustrato es tan elevada que prácticamente toda la enzima del sistema está presente en forma de complejo ES, es decir, cuando la enzima se halla saturada, se alcanzará la velocidad inicial máxima, $V_{m\acute{a}x}$, dada por:

$$V_{m\acute{a}x} = k_{+2}[E_T] \quad \text{Ec. (2.8)}$$

Finalmente, sustituyendo el valor de la ecuación (2.8) en la ecuación (2.7) se obtiene:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad E. c. (2.9)$$

Esta es la ecuación de Michaelis-Menten; es la ecuación de velocidad para una reacción de un solo sustrato, catalizada enzimáticamente. Relaciona la velocidad inicial, la velocidad máxima y la concentración inicial del sustrato a través de la constante de Michaelis-Menten. Es importante observar que aunque la ecuación de Michaelis-Menten parece no contener ningún término para la concentración de la enzima, en realidad ésta se halla en el término de $V_{m\acute{a}x}$.

2.5.2. Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima; por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye. Aunque los perfiles de las curvas de actividad en función del pH de muchas enzimas son acampanados, pueden variar considerablemente de forma. La relación entre el pH y la actividad de cualquier enzima depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato, así como de otros muchos factores que son por lo general difíciles de analizar cuantitativamente. La forma de la curva actividad-pH varía con la concentración del sustrato, ya que el valor de K_M de muchas enzimas varía con el pH. Las mencionadas curvas son mucho más significativas si la enzima se mantiene saturada con el sustrato en todos los valores de pH a los que se experimenta., el pH se mantiene constante al, o muy próximo al, pH óptimo.

El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal, el cual puede hallarse a su vez en la pendiente ascendente o descendente de su curva de pH-actividad. Este hecho sugiere que la

relación pH-actividad de una enzima puede constituir un factor en el control intracelular de su actividad.

2.5.3. Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas

Al igual que ocurre con la mayoría de reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activo. La velocidad de muchas reacciones enzimáticas se duplica, aproximadamente, por cada 10°C de aumento de la temperatura ($Q_{10} = 2.0$). Sin embargo, el coeficiente de temperatura Q_{10} , varía algo de una enzima a otra según la energía de activación de la reacción catalizada; es decir, de la altura de la barrera de energía para pasar al estado de transición.

Aunque las reacciones catalizadas por las enzimas parecen, con frecuencia, poseer una temperatura óptima, el pico que se observa al representar la actividad catalítica frente a la temperatura se produce porque las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan por la acción del calor y se inactivan cuando la elevación de temperatura sobrepasa un cierto punto. La aparente temperatura óptima es, por tanto, la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura, y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica. Aunque la mayoría de las enzimas se inactivan a temperaturas comprendidas entre 55 y 60°C, algunas de ellas son completamente estables y conservan su actividad a temperaturas superiores.

Algunas enzimas pierden actividad por calefacción pero la recuperan rápidamente por enfriamiento, lo cual indica que su cadena polipeptídica desplegada vuelve rápidamente a adoptar su conformación nativa.

2.5.4. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o en un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. Para este objeto es necesario saber:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. Si la enzima precisa de la adición de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. Su dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores; es decir, el valor de K_M para el sustrato y para el cofactor.
4. Su pH óptimo.
5. Una zona de temperatura en que sea estable y muestre actividad elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o la aparición de los productos de la reacción.

Generalmente, la medida de la velocidad de formación del producto de la reacción es más segura que la medida de la desaparición del sustrato, ya que éste debe estar, con frecuencia, en concentraciones bastante elevadas para garantizar la cinética de orden cero.

La determinación cuantitativa de la actividad enzimática se efectúa del modo más rápido y conveniente cuando el sustrato o el producto son coloreados o absorben luz en la región del ultravioleta, ya que la velocidad de aparición o de desaparición de un producto o de un sustrato que absorbe la luz puede seguirse con un espectrofotómetro. No deberán hallarse presentes otros componentes que absorban o dispersen la luz, pero en caso contrario, deberán prepararse los correspondientes blancos para efectuar la adecuada sustracción (Lehninger, 1995).

JUSTIFICACIÓN

Zacatecas tiene una antigua tradición mezcalera y con ello una importante oportunidad de desarrollo económico para sus regiones, sin embargo la producción de mezcal en las zonas productoras se ve afectada por problemas que actualmente están en camino de ser solucionados. Se tiene la creencia popular, que el Mezcal produce en el organismo un efecto similar al de un tónico, pues además de su inmediato efecto afrodisíaco, aseguran que el hábito de consumirlo, con moderación, prolonga la vida sexual del individuo y, por ende, la vida misma. En el estado de zacatecas existen dos regiones importantes donde se realiza este proceso, la región sur donde el procedimiento que se sigue es de manera rústica, y la región sureste donde se ha venido implementando un proceso totalmente industrializado. A pesar de la experiencia y grado de tecnificación que se ha logrado en las mezcaleras de la región sur del estado, aún no se han evaluado otros parámetros en la producción del mezcal; así como también no se ha puesto gran énfasis en la generación de subproductos que se producen durante todo el proceso; en especial en la fermentación. Es por ello, que en el presente trabajo se va a monitorear la producción de las enzimas: inulinasas, celulasas, xilanasas y pectinasas, presentes en los mostos de fermentación durante la producción de mezcal de manera natural, con el fin de saber en qué cantidad están presentes, y así en un futuro poder aislarlas, caracterizarlas y determinar su uso, en procesos de interés biotecnológico.

2.6. Objetivo General

Determinar las actividades enzimáticas presentes en extractos de mostos de fermentación durante la producción del mezcal.

2.6.1. Objetivos Particulares

1. Obtener la cinética de crecimiento de la cepa de levadura durante la fermentación.
2. Recolectar muestras durante las fermentaciones en medio líquido a partir de fermentadores a nivel industrial de la empresa “Hacienda de Robles” del municipio de Téul de González Ortega, Zacatecas, para su posterior análisis.
3. Determinar durante la fermentación la concentración de azúcares.
4. Determinar la concentración de proteína presente en los mostos de fermentación.
5. Cuantificar las actividades enzimáticas principales.

2.7. Hipótesis

Los mostos de fermentación por su naturaleza contienen una cantidad importante de enzimas, el hecho de determinar la cantidad en que están presentes y establecer el tiempo adecuado para su separación de la fermentación servirá para determinar sus aplicaciones industriales y comerciales en procesos biotecnológicos de interés.

3. METODOLOGÍA Y DESARROLLO

3.1. Localización del área de estudio

El presente trabajo se realizará en el Departamento de Química de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; así como en el Departamento de Biotecnología de la Unidad Académica de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

3.2. Proceso de obtención del mezcal.

En el apéndice A.6. se presenta un diagrama de flujo que contiene los pasos que se siguen para la producción del mezcal, en el cual se detalla información sobre el balance de masa que se realiza durante este proceso.

3.3. Material biológico

1. En el presente estudio, se emplearán muestras de piña cruda de los agaves agave *Weberi cela* (Azul) (Fig. 3.1.) con una edad de 6 a 8 años, ya que a esta edad los agaves presentan el mayor contenido de inulina por ser la etapa previa a la formación del quiote para su reproducción sexual (CIATEJ, 2004): así como también muestras de las piñas una vez cocidas, de las mieles de cocimiento, del mosto de fermentación de la empresa “Hacienda de Robles” Teúl de González Ortega de la región sur del estado de Zacatecas. Para la fermentación se empleará levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*).



Fig. 3.1. Piñas de agave *Weberi cela* (azul).

3.4. Tratamiento y procesado de las muestras para su estudio

A. Toma de muestra. Se tomarán muestras de 50 mL del mosto de fermentación en tubos cónicos estériles a los que se le agregarán 500 mg de azida de sodio, con el fin de inhibir la cadena respiratoria de las levaduras, de tal manera que quedará detenida la fermentación y nos permitirá obtener resultados más exactos sobre la cuantificación de azúcares reductores, proteínas y actividad enzimática. Antes de ser usadas las muestras líquidas, se filtrarán con una fibra de algodón y en ciertos casos con papel filtro. Todos los experimentos que se realizarán serán efectuados por triplicado.

B. Cinética de crecimiento. Se utilizará una tina de fermentación de acero inoxidable de 12,000 L de capacidad con 10,000 L de jugo de agave a 12 % de ART's y pH aproximado de 4.5, el cual será inoculado con 1 Kg de levadura seca a una temperatura de 35°C por 48 horas. El muestreo se realizará aproximadamente cada 6 horas hasta que el cultivo alcance la fase estacionaria donde se contará el número de células en una cámara de Neubauer y se determinará el porcentaje de viabilidad empleando el reactivo de azul de tripano.

C. Recuperación de las enzimas. Las muestras se tomarán cada 6 horas por 48 horas, que es el tiempo que dura la fermentación, estas se centrifugarán a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Al sobrenadante que se obtenga, se le evaluarán las actividades enzimáticas y se cuantificará la cantidad de proteína.

3.5. Población celular y porcentaje de viabilidad

Se determinará la población celular y su viabilidad. Para la población celular se contará directamente en el microscopio utilizando una cámara de conteo. Este método permite determinar el número de microorganismos contenidos en un volumen conocido de líquido. Para esto se utilizará la cámara de Neubauer (Fig. 3.2.) que tiene una cavidad de dimensiones conocidas, contándose los microorganismos presentes en una porción de volumen.

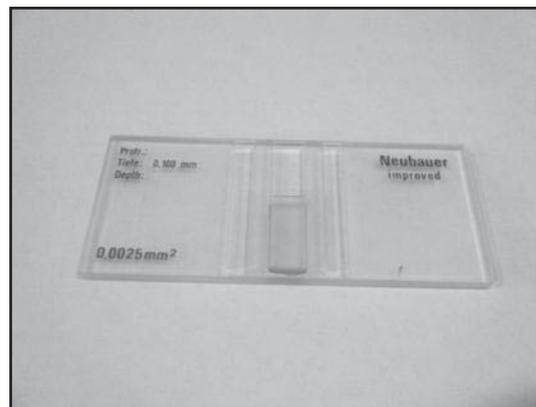


Fig. 3.2. Cámara de Neubauer.

La cámara está dividida en tres partes: dos laterales y una central. La parte central es más baja (0.1 mm) que las dos laterales. Además tiene una cuadrícula de 1 mm que está dividido en 400 pequeños cuadros de 1/20 mm de lado. Estos 400 cuadros están agrupados en 25 cuadros grandes que hacen el total de la cuadrícula. Sobre

las dos partes laterales se coloca un cubre objetos que deja un espacio de 0.1 mm de profundidad para la cámara de Neubauer, el cual es llenado con la suspensión celular (Fig.3.3.).

Se coloca la muestra por un costado de la cámara, la cual se distribuye por capilaridad. El conteo se realizará en cinco cuadros grandes de la cámara, comúnmente cuatro de los extremos y el central.

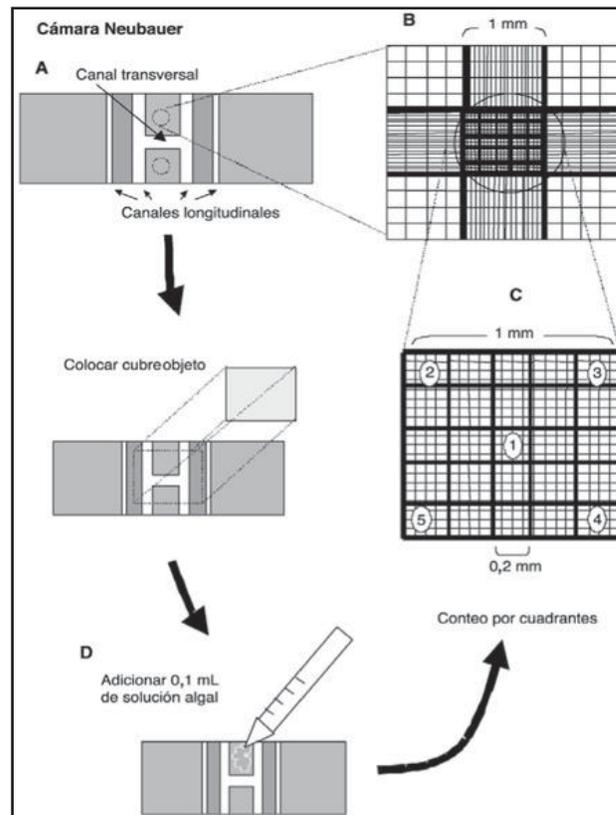


Fig. 3.3. Partes de la Cámara de Neubauer.

La cuenta total debe ser de al menos 150 células; aproximadamente 30 células por cuadro grande. Si hay menos de esa cantidad de células se deben contar más de cinco cuadros, y cuando el número de células es superior a 150 se hace una dilución.

La concentración de células por mililitro (X), está dada por la fórmula siguiente:

$$X = \text{No de células contadas} / \text{No de cuadros contados} \times D \times (25 \times 105)$$

D = Dilución de la muestra.

La principal ventaja de los recuentos microscópicos es que no necesitan ningún tiempo de incubación, por lo que su utilización se reserva habitualmente para aplicaciones en que el tiempo es el factor principal (Tortora y col., 1993).

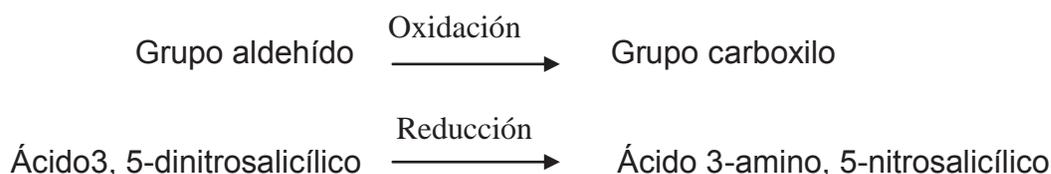
Por otro lado para la determinación de la viabilidad celular o porcentaje de células vivas será estimado por conteo al microscopio después de la coloración con azul de Tripano 0.4 %, las células vivas aparecen incoloras mientras que las muertas se colorean de azul. Para el modo de acción del colorante existen dos hipótesis: a) Las células muertas tienen una membrana frágil y permeable al azul de Tripano y b) El azul de Tripano penetra en todas las células pero las viables lo reducen gracias a su enzima deshidrogenasa.

Para el ensayo se tomará 1 mL de cada muestra y se le agregarán 2 gotas del colorante azul de Tripano 0.4 %. Después, se mezclará homogéneamente y se esperará 5 minutos manteniendo las muestras a temperatura ambiente. Luego se cargará la cámara de Neubauer con una micropipeta tomando 20 μ L de la muestra y luego se observará al microscopio con el objetivo de 40 X, contando las células incoloras (vivas) y las células coloreadas de azul (muertas). Cuando es necesario hacer la dilución de la muestra debido a la alta concentración células presentes, primero se hace la dilución y después se realiza el conteo de las células. Cálculos: porcentaje de Viabilidad = $\frac{\text{Células totales} - \text{Células muertas}}{\text{Células totales}} \times 100$.

3.6. Determinación de azúcares reductores

3.6.1. Método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Esta técnica determina la presencia de grupos carbonilos libres (C=O), los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y, al mismo tiempo su propia reducción, desarrollándose la siguiente reacción:



Según lo anterior, un mol de azúcar reaccionará con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una relación estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Esta reacción, además, se puede seguir fácilmente al espectrofotómetro ya que da lugar a una reacción colorimétrica: el ácido 3,5-dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición del ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro-marrón, cuya intensidad será, por tanto, proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes (Miller, 1959).

A diferencia del método volumétrico de Lane – Eynon que es avalado por el COMERCAM, el método del DNS resulta más fácil en su ejecución, ahorrando incluso la mitad del tiempo requerido por muestra (Do Nascimento Silva y col., 2003). Además de ser también un método ampliamente aplicado en la industria de los alimentos (Mottin y col., 2002). Y al ser método colorimétrico su límite inferior de cuantificación es mucho menor que el de Lane – Eynon, permitiéndonos determinar concentraciones muy por debajo de 1% de ART's.

1.- Una vez formada la curva de estándares para la validación del método (ver apéndice A-1.), se prosigue a tomar la lectura de las muestras: para esto se tomará

0.1 mL con una micropipeta de la muestra en un tubo de ensaye, se le agregarán 1.9 mL de agua destilada para obtener una dilución de 1:20 de la muestra.

2.- Posteriormente se agregarán 3mL del reactivo del DNS, se agitará en un vórtex los tubos con las muestras (Fig. 3.4.).

3.- Después de esto se pondrán a ebullición en baño maría durante 15 min; pasados los 15 min se le agregarán 15 mL de agua destilada a cada tubo y se leerán en el espectrofotómetro o colorímetro a una longitud de onda de 550 nm.

Los resultados de las absorbancias se compararán con la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración para conocer la concentración de los azúcares de las muestras (Miller, 1959).



Fig. 3.4. Preparación de los tubos con DNS para la curva de curva de calibración y para las muestras

3.7. Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se medirá de manera colorimétrica en el espectro (Bradford, 1976), donde se adicionarán en varios tubos eppendorf cantidades de 1 a 5 μ L de muestra ajustando a un volumen de 800 μ L con solución de NaCl 150 mM (ver apéndice A-2.), después se añadirán 200 μ L de solución de trabajo Bradford (ver apéndice A-2). Se agitarán los tubos en el vortex y se dejarán

reposar por 3 minutos a temperatura ambiente. Después se transferirá a una cubeta de plástico y se leerá la absorbancia a una densidad óptica de 595 nanómetros en la región visible. El blanco para ajustar el espectrofotómetro a cero, contiene 800 μL de NaCl 150 mM + 200 μL de solución de trabajo Bradford. La cantidad de proteína se calcula, interpolando la densidad óptica obtenida en una curva patrón de proteína o sacando la regresión lineal y sustituyendo el valor en la ecuación de una recta (ver apéndice A-2). Cada determinación se hará por triplicado.

3.8. Determinación de actividades enzimáticas

3.8.1. Actividad inulolítica

La actividad de inulinasas se determina midiendo los grupos reductores liberados a partir de la inulina por la acción enzimática de los filtrados colectados por el método de Miller con la solución del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El grupo nitro del DNS (incolore) reacciona con el carbón anomérico del azúcar dando lugar a un compuesto cromóforo, donde el fenol aumenta el color producido y el metabisulfito de sodio, estabiliza el color obtenido en presencia de grupos fenólicos. La actividad inulolítica se va determinar al colocar 0.5 mL de la enzima diluida (sobrenadante de muestras) y 1 mL de una solución al 5% de fructosas de *Agave tequilana* Weber variedad azul (sustrato), en buffer de acetatos (pH 5.5 y 0.1 M), se van a preparar una muestra y dos blancos, uno para el sustrato y otro para la enzima. Se colocan las tres preparaciones en baño de agua a 50°C por 30 minutos, la reacción se pone a ebullición por 5 minutos y se determinan los azúcares reductores a 550nm por el método de DNS (Wood, 1988). La actividad enzimática presente en un experimento dado, toma en cuenta el volumen del ensayo y es expresada en nanocatalas / mL. Ésta también puede ser expresada en términos de unidades / mL, donde una unidad (U) de actividad enzimática, es definida como la cantidad de enzima que libera una micromol (μmol) de grupos reductores (expresados como equivalentes de inulina) por minuto, bajo las condiciones de ensayo ($U = 1 \mu\text{mol} / \text{min} = 1000 \text{ nmol} / 60 \text{ s} = 16.67 \text{ nmol} / \text{s}$). Así una unidad es equivalente a 16.67 nanocatalas (ncat). Para el caso de

la actividad específica, dividir las unidades enzimáticas de interés entre los miligramos totales de proteína.

3.8.2. Actividad celulolítica

La actividad de celulasas sobre carboximetil celulosa (CMC) (sal de sodio de Sigma Chemical Co.) se determina midiendo los grupos reductores liberados a partir de la celulosa, por la acción enzimática de los filtrados colectados por el método de Miller. El sistema de reacción contiene en un tubo de ensaye (22x125mm) 1.0 mL de una solución de CMC al 0.75% en buffer acetato de sodio 0.1M pH 5.5 más 0.5 mL del mismo buffer, todo esto contenido en un tubo de ensaye. Los tubos son preincubados por 3 min a 50°C en un baño y posteriormente se añaden 0.5 mL de enzima sin diluir o apropiadamente diluida y la mezcla completa se incuba a diferentes tiempos (30 y 60 minutos) a 50°C. La reacción se detiene añadiendo 3 mL de DNS, para luego poner en ebullición a baño María por 5 minutos, después se diluye la mezcla con 15 mL de agua destilada y se lee la D.O. a una absorbancia de 550 nm en el espectrofotómetro. Cada determinación se hace por triplicado y para cada una de las muestras se prepara un control ó tiempo cero de reacción, agregando antes el DNS para inactivar la enzima. La actividad enzimática es expresada en términos de unidades / mL, donde una unidad es definida como la cantidad de enzima que libera una micromol de glucosa por minuto, bajo las condiciones de ensayo. Para obtener la concentración de μ moles de glucosa liberados por la enzima, se toma que 10 μ moles de glucosa producen 1 de D.O. y se realiza una regla de tres, quedando así: lectura en D.O por 10 sobre 1 = concentración en μ moles.

3.8.3. Actividad xilanolítica

La actividad de xilanasas se determina midiendo los grupos reductores liberados a partir de xilanos por la acción enzimática de los filtrados colectados por el método de Miller con la solución del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El grupo nitro del DNS (inoloro) reacciona con el carbón anomérico del azúcar dando lugar a un compuesto cromóforo, donde el fenol aumenta el color producido y el metabisulfito de

sodio, estabiliza el color obtenido en presencia de grupos fenólicos. El sistema de reacción contiene en un tubo de ensaye (22x125mm) 1.0 mL de una solución de xilanos de abedul (birchwood, Sigma Chemical Co.) al 0.75% en buffer acetato de sodio 0.1M pH 5.5 más 0.5 mL del mismo buffer, todo esto contenido en un tubo de ensaye. Este sistema se preincuba por 3 min a 50°C en un baño maría y posteriormente se añaden 0.5 mL de enzima sin diluir o apropiadamente diluida y la mezcla completa se incuba a diferentes tiempos (3, 5 y 10 minutos) a 50°C. La reacción se detiene añadiendo 3 mL de DNS, para luego poner en ebullición a baño María por 5 minutos, después se diluye la mezcla con 15 mL de agua destilada y se lee la D.O. a una absorbancia de 550 nm en el espectrofotómetro. Los azúcares reductores liberados de la reacción se cuantifican interpolando la densidad óptica obtenida en una curva patrón de xilosa (Sigma Chemical Co.). Cada determinación se hace por triplicado y para cada una de las muestras se prepara un control ó tiempo cero de reacción, agregando antes el DNS para inactivar la enzima. La actividad enzimática presente en un experimento dado, toma en cuenta el volumen del ensayo y es expresada en nanocatalas / mL. Ésta también puede ser expresada en términos de unidades / mL, donde una unidad (U) de actividad enzimática, es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol (μmol) de grupos reductores (expresados como equivalentes de xilosa) por minuto, bajo las condiciones de ensayo ($U = 1 \mu\text{mol} / \text{min} = 1000 \text{ nmol} / 60 \text{ s} = 16.67 \text{ nmol} / \text{s}$). Así una unidad es equivalente a 16.67 nanocatalas (ncat). Para el caso de la actividad específica, dividir las unidades enzimáticas de interés entre los miligramos totales de proteína.

3.8.4. Actividad pectinolítica

Las pectinasas fueron determinadas por la reducción de la viscosidad de la solución de la pectina del 1% a 30°C y pH 4.2, usando un viscosímetro de Ostwald según lo descrito previamente (Larios, 1989). Una unidad (U) fue definida como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad inicial de la solución de la pectina al 50%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Azúcares reductores totales (ART's)

Luego de que se obtuvieron las muestras del mosto de fermentación; se empleó el método del DNS para la determinación de azúcares reductores; estos se midieron en las tinajas de fermentación a diferentes tiempos, observando que al inicio de la fermentación se tenían aproximadamente 12% de ART's (Fig. 4.1.) lo cual es la cantidad idónea para que las levaduras metabolicen los azúcares, conforme pasa el tiempo va disminuyendo la concentración de azúcar, esto se debe a que la levadura metaboliza los azúcares para producir alcohol, esto a su vez se comprobó por el método Lane-Eynon que es la metodología oficial aprobada por el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) para la determinación de azúcares reductores totales (ART's); pero se empleo el del DNS porque es más sencillo de realizar, requiere de menos tiempo y es más seguro para la persona que lo realiza. Al final de la fermentación (mosto muerto) tuvimos aproximadamente 2% de ART's, lo cual nos indica que la fermentación ha terminado y que la levadura empieza ahora a producir ácido acético.

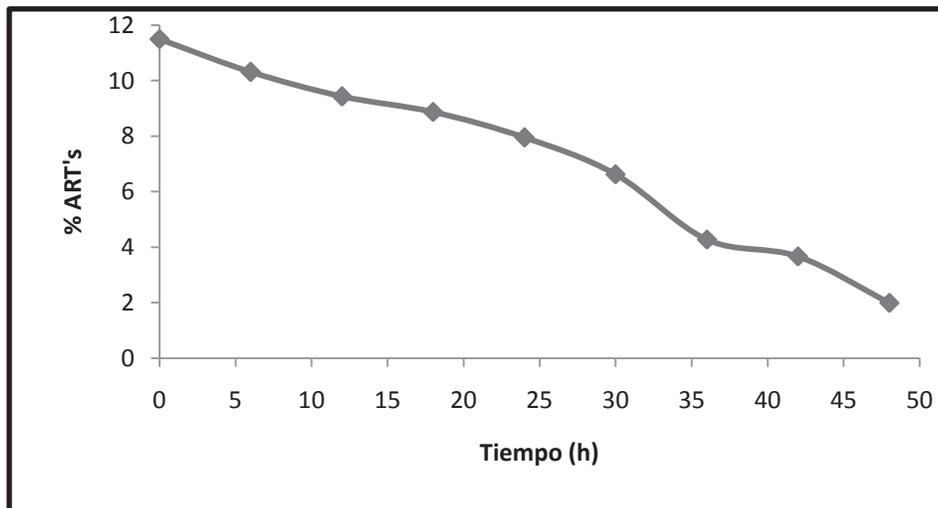


Fig. 4.1. Determinación de azúcares durante la fermentación

4.2. Determinación de población celular y porcentaje de viabilidad

Las cinéticas realizadas con *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en jugo de agave al 12% de ART's se realizaron con el objeto de conocer el comportamiento del crecimiento de las levaduras durante la fermentación.

Se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer, donde se pudieron observar al microscopio las células viables y no viables como se muestra en las figuras 4.2 y 4.3, distinguiéndose estas últimas por encontrarse teñidas de color azul (Fig. 4.3). De acuerdo con los resultados recolectados sobre la población celular y viabilidad, el tiempo óptimo para la recolección de las muestras más viables fueron a las 6 y 12 horas en la tina de fermentación; que fue el tiempo en que mayor número de células se encontró (Tabla 4.1). Esto coincide con lo ya reportado, ya que al inocular un número determinado de células vivas de levadura en un medio de cultivo apropiado, que en este caso es el mosto de los agaves cocidos para la fermentación se requiere tomar células en crecimiento. La velocidad específica de crecimiento de las levaduras μ es igual a 0.1845 h^{-1} . Para su interpretación la cinética de crecimiento se divide en cuatro fases muy bien definidas (Fig. 4.4): 1. Fase de retraso, antes de que la división celular comience. 2. Fase exponencial, cuando las células se dividen a una velocidad constante. 3. Fase estacionaria, la división celular cesa y 4. Fase de muerte.

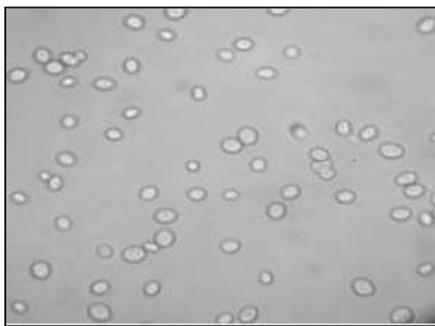


Fig. 4.2. Células de Levaduras viables.

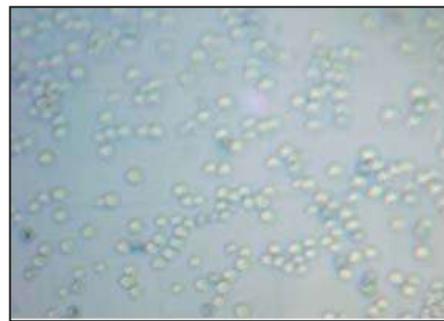


Fig. 4.3. Células de Levadura no viables (teñidas en azul).

Tabla 4.1. Resultados de población celular y por ciento de viabilidad de levaduras

Tiempo (h)	Población celular (células/mL)	% de viabilidad
6	6,754	93.5
12	45,675	91.9
18	61,780	84.3
24	60,375	81.2
30	21,000	39.6
36	20,456	35.7
42	18.395	30.5
48	15,824	28.2

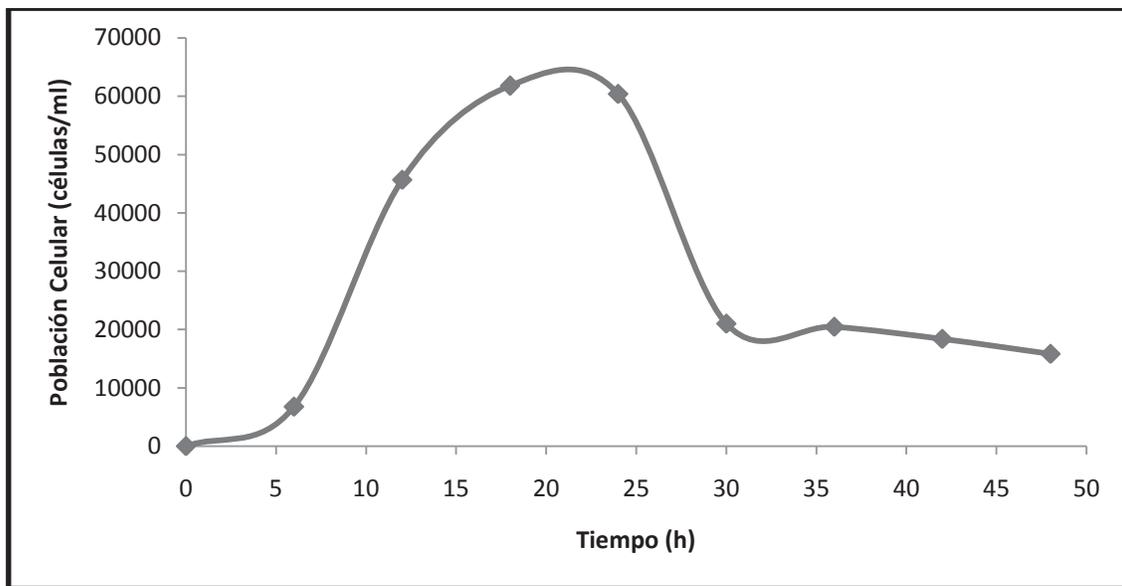


Fig. 4.4. Curva de crecimiento celular de levaduras

4.3. Inulinasas

Se observó el comportamiento de la actividad inulolítica durante toda fermentación, es visible la actividad desde el inicio del proceso (Fig. 4.5.) y fue en aumento de 1 hasta 4.5 U/ml en las primeras 24 horas, a las 48 horas se observa todavía aumento en la actividad el cual va llegando a su punto máximo, posiblemente por la acumulación de inulinasas. En ningún momento se observa que haya alguna

represión de la actividad. La constante de velocidad de la reacción catalizada por las inulinasas obtenida fue para K_M igual a 1.3606 mol/mL. (Ver apéndice A. 4.)

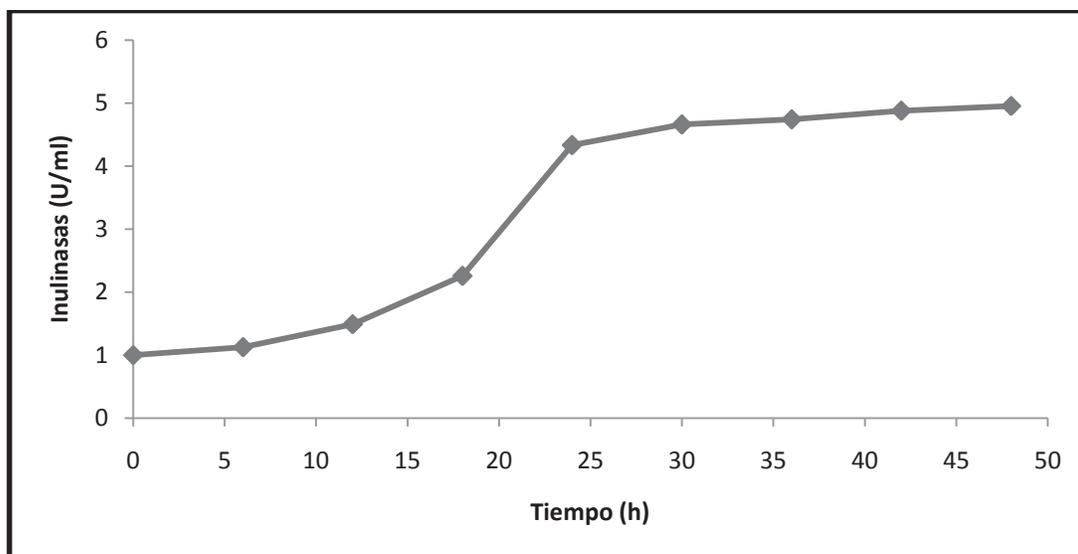


Fig. 4.5. Actividad inulolítica en los mostos de fermentación

Estos resultados permiten pensar sobre el gran potencial en actividad que presentan las inulinasas en el proceso de elaboración del mezcal y de la importancia que estas enzimas podrían tener en el proceso ya que aún finalizada la fermentación todavía se puede ver cierta actividad.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Corona y col., (2005) quienes determinaron la actividad de inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de agave *tequilana Weber* variedad azul obteniendo 110 U / ml y 170 U / mL a un pH de 4 y 5.5, respectivamente, apreciando también el potencial que tiene esta enzima en la producción de mezcal y la importancia que tendrían estas aplicadas a otros procesos.

De acuerdo con los resultados el tiempo más adecuado para separar las inulinasas de la fermentación sería después de las 24 horas ya que es donde estas enzimas presentan su mayor actividad.

4.4. Celulasas

En la Fig. 4.6. se observa que la actividad celulolítica se presentó desde el inicio de la fermentación, la actividad enzimática alcanzó su máximo nivel a partir de las 30 horas (1.7 U / mL). Pasadas las 30 horas y hasta la culminación del monitoreo a las 48 horas se observa un decaimiento en los valores de la actividad de celulasas, esto puede ser debido al consumo y disponibilidad de azúcares durante la fermentación. La constante de velocidad de la reacción catalizada por las celulasas obtenida fue para K_M igual a 0.4854 mol / mL. (Ver apéndice A. 4.)

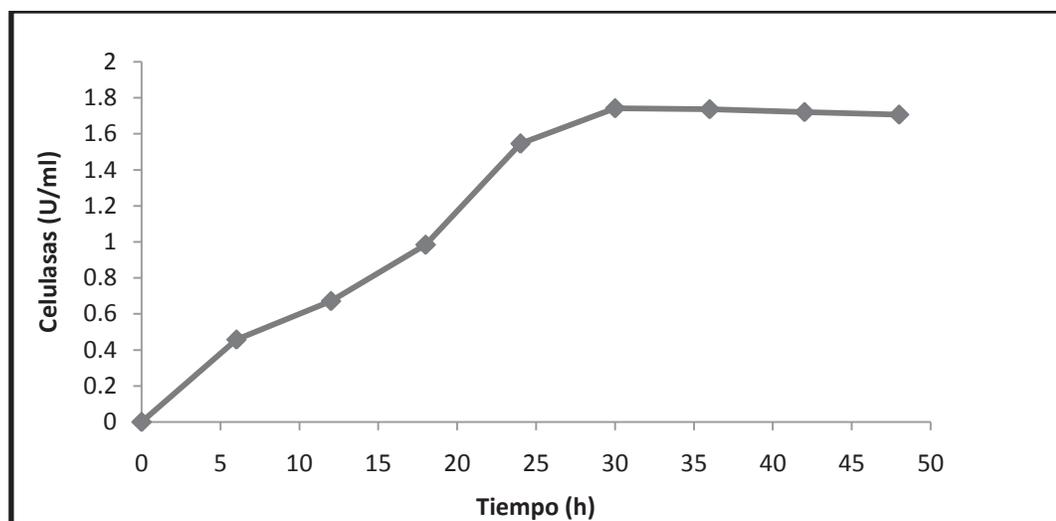


Fig. 4.6. Actividad celulolítica en los mostos de fermentación

Cabe señalar que la actividad celulolítica que se obtuvo corresponde con lo reportado por Sánchez y col., (2006) que estudiaron la producción de celulasas por *Daldinia sp.* en residuos de *Henequen* obteniendo un valor de 0.43 U / mL. La actividad de celulasas obtenida se manifiesta de manera superior a la reportada, esto puede ser debido a la levadura (*saccharomyces cerevisae*) que se utiliza y al medio (jugo de agave) donde se llevan a cabo las reacciones, lo que indica la gran concentración de celulasas que se presentan en la producción del mezcal.

En caso de aislamiento y caracterización de estas enzimas se estima que el tiempo adecuado para separarlas de la fermentación sería después de las 24 horas que es donde muestran los valores más altos de actividad.

4.5. Xilanasas

La actividad xilanolítica se observa desde las primeras seis horas de la fermentación (Fig. 4.7.), llegando a 1.5 U / mL a las 18 horas, aumentando a 3.5 U / mL a las 24 horas y manteniéndose constante 36 horas con un valor máximo de 3.62 U / mL., siendo esta la fase estacionaria. Hacia el final de las mediciones a las 48 horas se observa un decaimiento de la actividad xilanolítica que puede ser debida al consumo de sustrato y azúcares dentro de la fermentación para esos tiempos. La constante de velocidad de la reacción catalizada por las xilanasas obtenida fue para K_M igual a 1.0593 mol / mL. (Ver apéndice A. 4.)

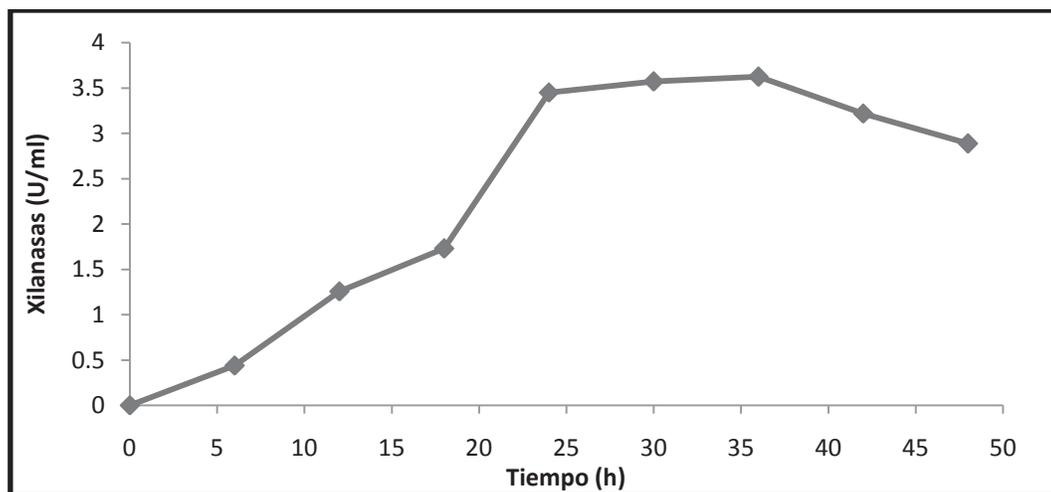


Fig. 4.7. Actividad xilanolítica en los mostos de fermentación

Con los resultados obtenidos se considera separar las xilanasas a las 24 horas de la fermentación.

Los resultados obtenidos presentan variaciones con lo reportado por Diorio y col., (2003) en su estudio de actividades enzimáticas para *Saccobolus saccoboloides*

(Fungi, Ascomycotina), presentan fluctuaciones desde el inicio de la fermentación obteniendo un valor máximo de 119.3 U /mL, y un temprano decaimiento de su actividad, esto puede ser debido a el hongo que se usa para las determinaciones. Se puede decir que el proceso de elaboración del mezcal al ser un productor de enzimas xilanolíticas de manera natural y donde la acción de la levadura sobre el sustrato favorece la producción de las mismas presenta una clara ventaja sobre lo reportado.

4.6. Pectinasas

En la Fig. 4.8 se observa que la actividad de pectinasas se manifiesta desde las primeras horas llegando a su máximo entre las 24 y 36 horas con una actividad de 1.7 U / mL habiendo después de esta hora disminución en la actividad, tal vez debido al consumo de sustrato y azúcares durante la fermentación. La constante de velocidad de la reacción catalizada por las pectinasas obtenida fue para K_M igual a 0.4331 mol / mL. (Ver apéndice A. 4.)

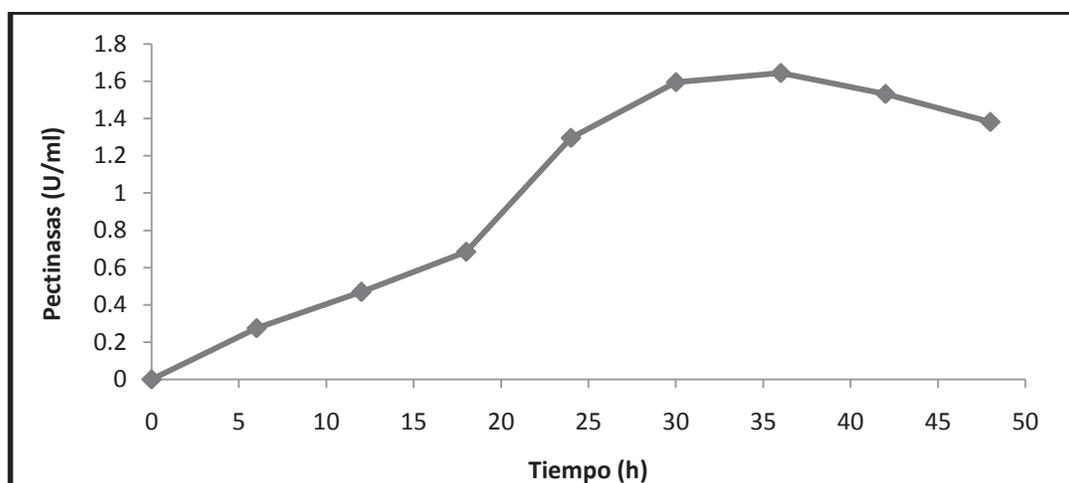


Fig. 4.8. Actividad pectinolítica en los mostos de fermentación

Analizando los resultados de actividad pectinolítica se optaría por separar estas enzimas de la fermentación desde las 24 horas.

Los resultados obtenidos de pectinasas utilizando como sustrato la pectina presentan diferencias con lo reportado por Aguilar y Huitrón, (1990). Reportan una actividad pectinolítica con el hongo *Aspergillus sp.* utilizando varios medios como fuente de carbono. En las pruebas donde usan la pectina como medio obtuvieron valores aproximados de 80 U / mL y 110 U / mL como máximos, sin embargo se observa en su estudio variaciones en la actividad de pectinasas, lo cual puede ser debido a que el hongo que utilizan no es el adecuado para trabajar con estas enzimas. En este sentido los valores que se presentan en este trabajo sugieren una actividad pectinolítica más estable, que se debe al medio y levadura que se están utilizando. De otra forma esto resalta la ventaja que tiene el proceso de elaboración de mezcal en la producción de pectinasas, ya que se trata de un medio natural en donde las enzimas se manifiestan en gran cantidad.

4.7. Determinación de Proteínas

Por otra parte también se realizó la determinación de Proteínas extra celulares (Bradford, 1976); donde se observó que desde el inicio a las 6 horas la concentración de proteínas fue de 1.69 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y se mantuvo constante durante toda la fermentación hasta 2.06 $\mu\text{g} / \text{mL}$ al final de la fermentación (Fig. 4.9). Como se puede observar la producción de proteínas tiene correspondencia con el crecimiento de las levaduras y con la producción de las enzimas que hidrolizan los azúcares para la producción de alcohol.

Tabla 4.2. Datos de la Concentración de Proteínas Durante la Fermentación.

Muestra	Absorbancia a 595 nm	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
6	0.099	1.69
12	0.122	1.83
18	0.129	1.87
24	0.141	1.94
30	0.147	1.97
36	0.156	1.98
42	0.167	2.01
48	0.173	2.06

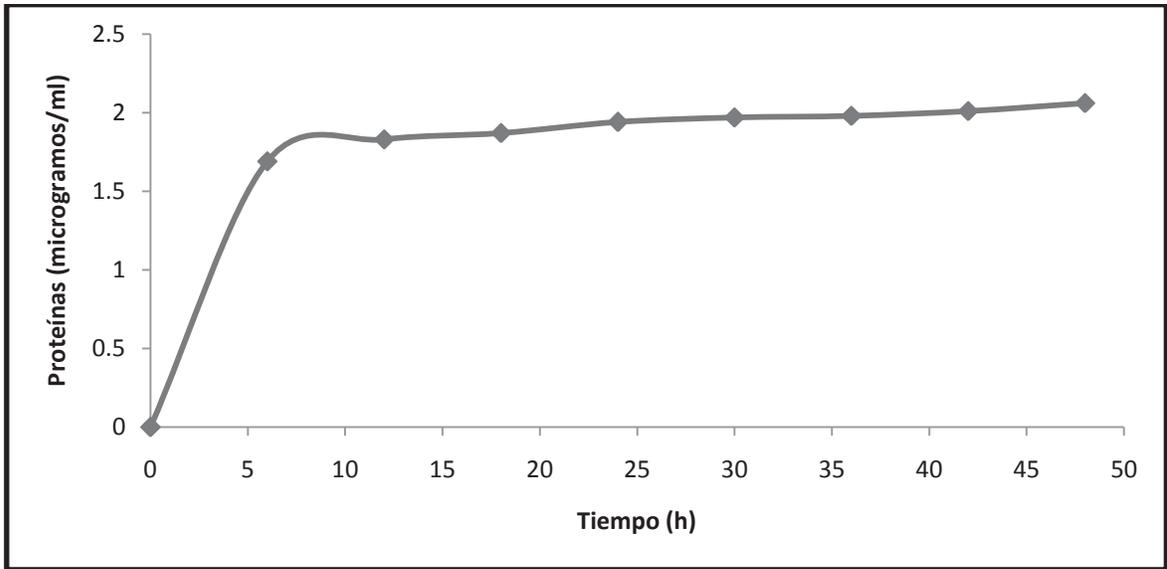


Fig. 4.9. Determinación de proteínas durante la fermentación

5. CONCLUSIONES

A partir de las determinaciones realizadas durante el desarrollo del presente trabajo se concluye lo siguiente:

1. El porcentaje de azúcares reductores ART's sirvió como medida para determinar el momento en que termina la fermentación, por otro lado el método del DNS que fue utilizado para esta medición también sirvió para la cuantificación de las actividades enzimáticas que fueron realizadas posteriormente.
2. Para la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación se verificó la viabilidad de estas obteniéndose cantidades cerca de los 60,000 células / mL con porcentajes de viabilidad del 81%.
3. Las pruebas para la determinación de actividades enzimáticas se realizaron de manera satisfactoria, corroborándose la presencia de las diferentes enzimas en la producción del mezcal, en caso de que se buscara separarlas de los mostos de fermentación para aislarlas o purificarlas, los tiempos comprendidos entre las 24 y las 30 horas serían un tiempo bastante adecuado ya que en ese rango es donde se presentan los valores máximos de actividad para cada una de las enzimas.
4. Las constantes de velocidad calculadas para las reacciones catalizadas por estas enzimas muestran una correspondencia directa con las actividades presentadas por las mismas enzimas. De esta manera se corrobora el trabajo que desarrollan estas enzimas como catalizadores en la producción de mezcal y la importancia que tendría continuar estudiándolas para su uso industrial.

5. Con respecto a la cantidad de proteínas. Se encontró una temprana producción que durante toda la fermentación se mantiene constante con valores entre 1.69 y 2.06 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Estos valores resaltan la gran producción de enzimas que se tiene ya que como se sabe las enzimas son consideradas proteínas y de ahí que la producción de proteínas se mantenga constante durante toda la fermentación.

6. Los resultados obtenidos sobre los diferentes parámetros en este estudio presentan una gran correspondencia y resaltan al proceso de elaboración del mezcal en su etapa de fermentación como un importante medio para la producción de enzimas.

5.1. Sugerencias para trabajo a futuro

- 1) Concentrar los sobrenadantes donde se encuentren las enzimas extracelulares por ultrafiltración ó rotaevaporación y montar columnas de exclusión molecular, intercambio iónico ó afinidad; para su purificación.
- 2) Caracterizar las enzimas en cuanto al efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima.
- 3) Recuperar las enzimas adsorbidas al sustrato y compararlas con las enzimas que se encuentran libres en el sobrenadante.
- 4) La industria mezcalera genera grandes cantidades de hojas ó pencas de *Agave tequilana Weber* que se inutilizan en la elaboración de mezcal, pero contiene azúcares que podrían emplearse en la producción de enzimas, con lo que se buscaría abaratar los costos de producción. Por lo cual se contempla realizar estudios para obtener azúcares de estas hojas de agave y aprovecharlas en la producción de enzimas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, G. y Huitrón, C.** (1990). Constitutive Exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnology Letters*. 12 (9), 655-660.
- Aguirre Rivera, J. R.** (2001). El Maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. Gobierno del Estado de San Luis Potosí.
- Biely, P.** (1985). Microbial xylanolytic systems, *Trends in Biotechnology*, 3 (11): 286 – 290.
- Biely, J., Ranua, M., Kantelinen, A. y Viikari, L.** (1992). The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of Byochemistry. Cap. 4 John Wiley & Sons N. Y. pp. 136 – 167.
- Bradford M.,** (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein. *Analytical Biochemistry*, vol. 72: 248-255.
- Carasik, W. y Carroll, J. O.** (1983). Development of immobilized enzymes for production of high fructose corn syrup. *Food technology* 37 (10): 85-91.
- Cho, Y. J. y Yun, J. W.** (2002). Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Proc. Biochem.* 37: 1325-1331.
- CIATEJ,** Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas (2004). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseños del Estudio de Jalisco A.C. ISBN 970-9714-00-7.

COMERCAM, (2004). Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A.C. FUNDACIÓN PRODUCE ZACATECAS, A.C., SEDEZAC, SEFOA 2000. Primer Foro del Agave y el Mezcal.

Coughlan, M. P. y Hazlewood, G. P. (1993). β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology Applied Biochem.* 17: 259-289.

Corona González R. I., Pelayo Ortiz C., González Álvarez V. y Zúñiga Partida V., (2005). Optimización de La producción de inulinasas por *Saccharomyces sp.* a partir de agave tequilana *Weber* variedad azul. E-Gnosis. Revista digital Científica y Tecnológica. Universidad de Guadalajara, México. Vol.3. p. 6-9

Do Nascimento Silva R, Neves Monteiro V, Ximenes Alcanfor J, Meire Assis E, (2003). Comparação De Métodos Para A Determinação De Açúcares Redutores E Totais Em Mel.

Derycke, D. G. y Vandamme, E. J. (1984). Production and properties of *Aspergillus niger inulinase*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B: 45-51.

Diorio L. A., Forchiassin F., Papinutti V. L. y Sueldo D. V., (2003). Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Rev Iberoam Micol. 20: 11-15

Drouet, P. Zhang, M. y Legoy, M. D. Enzymatic synthesis of alkyl beta-D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, (May 1994); 43(11): 1075-80.

Edelman, J. y Jefford, T. G. (1964). The metabolism of fructose polymers in plants. *Biochem. J.* 93:148-161.

- Elyachioui, M., Hornez, J. P. y Tailliez, R.** (1992). General properties of extracellular bacterial inulinase. *Journal of Applied Bacteriology*. 73: 514-519.
- Flores, D.** (1995). Sugar high fructose corn syrup update. American embassy, México City. <http://ffas.usda.gov./ntdb/apwrlid/htmlfiles/mX5067.html,1-2>.
- Fogarty, W. M. y Kelly, C. T.** (1983). Pectic enzymes. In: Microbial Enzymes and Biotechnology (Fogarty, W. M.; De), pp. 131-182. Applied Science Publishers, London.
- Gupta, A. K., Rathore, P., Kaur, N. y Singh, R.** (1990). Production, thermal stability and immobilization of inulinase from *Fusariumoxysporu*. *J. Chem. Tech. biotechnol.* 47: 245-257.
- Gupta, A. K. y Kaur, N.** (1992). Properties of β -fructofuranosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxyporum* grown on an aqueous extract of *Cichoryum intybus* roots. *J. Chem. Tech. biotechnol.* 53: 279-284.
- Gupta, A. K., Singh, P., Kaur, N., Singh. R.** (1994). Production, purification and immobilization of inulinase from *kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Tech. biotechnol.* 59: 377-385.
- Johnston, D. J. y Williamson, B.** (1992). Purification and characterization of four Polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 96, (5), 343-349.
- Kalil, S. J., Suzan, R., Maugeri Filho, F. y Rodríguez, M. I.** (1999). Evaluation on inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus* ATTC 16045. ENPROMER'99. II congreso de Engenharia de Processos do MEROSUL. 30 de agosto a 02 de septiembre de 1999. Florianópolis-Santa Catarina-Brasil.

- Kirka Ronel S., Sawyer R. y Egon H.** (2000). Composición y análisis de alimentos de Pearson, 9ª. Edición. Editorial CECSA.
- Larios, G., García, J. M. y Huitrón, C.** (1989). Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Biotechnology Letters*. 11 (10), 729-734.
- Lehninger, Albert L.** (1995). Enzimas: cinética e inhibición. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A., Barcelona. 8: 189-222
- Maldonado, M. C., Strasser de Saad, A. M. y Callieri, D. A.** (1989). Catabolite repression of the synthesis of inducible Polygalacturonase and Pectinesterase by *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*. 18, 303-306.
- Manachini, P. L., Fortina, M. G. y Parini, C.** (1987). Purification and properties of an Endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*. 9 (3), 219-224.
- Mandels, M.** (1976). Microbial sources of cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5: 81-105.
- McMillan, G. P., Johnston, D. J. y Pérombelo, M. C. M.** (1992). Purification to homogeneity of extracellular poly galacturonase and isoenzymes of pectate lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* by column chromatography. *Journal of Applied Bacteriology*. 73, 83-86.
- Medina Rodríguez J.L.** (2001). La Reconversión Productiva una Alternativa de Desarrollo Rural Sustentable. Ponencia en el Segundo Foro del Agave y el Mezcal. Zacatecas, México.

Miller. D. D., Química de Alimentos, Manual de Laboratorio, 1^a. Ed. Editorial Limusa y Wiley, (2001).

Miller G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, p. 426 – 429,

Montenecourt, B. S., Eveleigh, D. E., Elmund, G. E. y Parcels, J. (1978). Antibiotic disks -an improvement in the filter paper assay for cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 297-300.

Mottin Demiate I, Wosiaki G, Czelusniak C, Nogueira A. (2002). Analysis of Total and Reducing Sugar in Food. A Comparative Study Between Colorimetric and Titriation Thecniques

Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994- Bebidas Alcohólicas -Mezcal- Especificaciones (1994). Diario Oficial de la Federación.

Onodera, S. y Shiomi, N. (1992). Purification and subsite affinities of exo-inulinase from *Penicilliumtrzenbinskii*. *Biosc. Biotech. Biochem.* 56 (9): 1443-1447.

Pessoni, R. A. B., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. y Braga, M. R. (1999). Extracelular inulinases from *penicillium janozewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vermonia herbacea* (Asteraceae). *J. appl. Microbiol.* 87: 141.147.

Pettipher, G.L., Latham, M. J., J. Gen. Microbiol, (1979). Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus*.

Sakai, T. (1992). Degradation of Pectins. In: Microbial degradation of natural products. (Winkelmann, G: De) pp. 57-80.

SEDEZAC, Zacatecas (2004). Tierra de la Plata y el Mezcal. Gobierno del Estado de Zacatecas, Secretaria de Desarrollo Económico. 1ª. Edición.

Skowronek, M. y Fiedurek, J. (2004). Optimization of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method. *Food Technol. Biotechnol.* 42 (3): 141-146.

Tortora G., Funke B. y Case C. (1993), Introducción a la Microbiología 3ª. Ed. Acribia, Zaragoza España.

Vranesic, D. Kurtanjek, Z. y Santos A. M. P. (2002). Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food technol. Biotechnol.* 40 (1): 67-73.

Voragen, A. G. J. y Pilnik, W. (1995). In: Food Polysaccharides and their applications. (Stephen, A. M.: De), pp, 287-338. Marcel Dekker, Inc. USA.

Whitaker, J. R. (1994). Pectic enzymes. In: Principles of enzymology for the food sciences. Second Edition. pp.425-436. Marcel Dekker, Inc. USA.

Wood, W. A. y Kellog, S. T. (1988). Cellulose and Hemicellulose. Methods in Enzimology. Academic Press, Inc. 160: 91-98.

Pagina web: www.wikipedia.org/wiki/Inulina (2007).

ÁPENDICE

A.1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES

Solución del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Tabla. A.1. Para la determinación de azúcares reductores.

Reactivos	Cantidades
Hidróxido de sodio	1.40%
Ác. 3,5-dinitrosalicílico	0.75%
Tártrato de sodio y potasio	10.0%
Fenol	0.54%
Metabisulfito de sodio	0.59%

Los reactivos se disuelven lentamente uno por uno en agua destilada en el orden indicado y luego se afora la mezcla al volumen deseado. Después se filtra la solución con vacío, utilizando un matraz kitazato con embudo Buchner, al cual se le coloca un papel filtro (Whatman No.1). Una vez filtrada la solución, se almacena ésta a temperatura ambiente en frasco ámbar y se deja reposar por 24 horas antes de su uso. Estable indefinidamente. (Solución estándar).

Validación del método del DNS para la medición de ART's en el proceso de elaboración de mezcal

Una vez que se ha establecido la gráfica de calibración, se puede obtener la concentración del analito en cualquier muestra por interpolación. En esta ocasión como desconocíamos entre que valores de x caerían los valores de las absorbancias de nuestras muestras, se hicieron tres curvas de calibración: la primera con concentraciones de la solución estándar de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1mg/mL. (Fig. A-1):

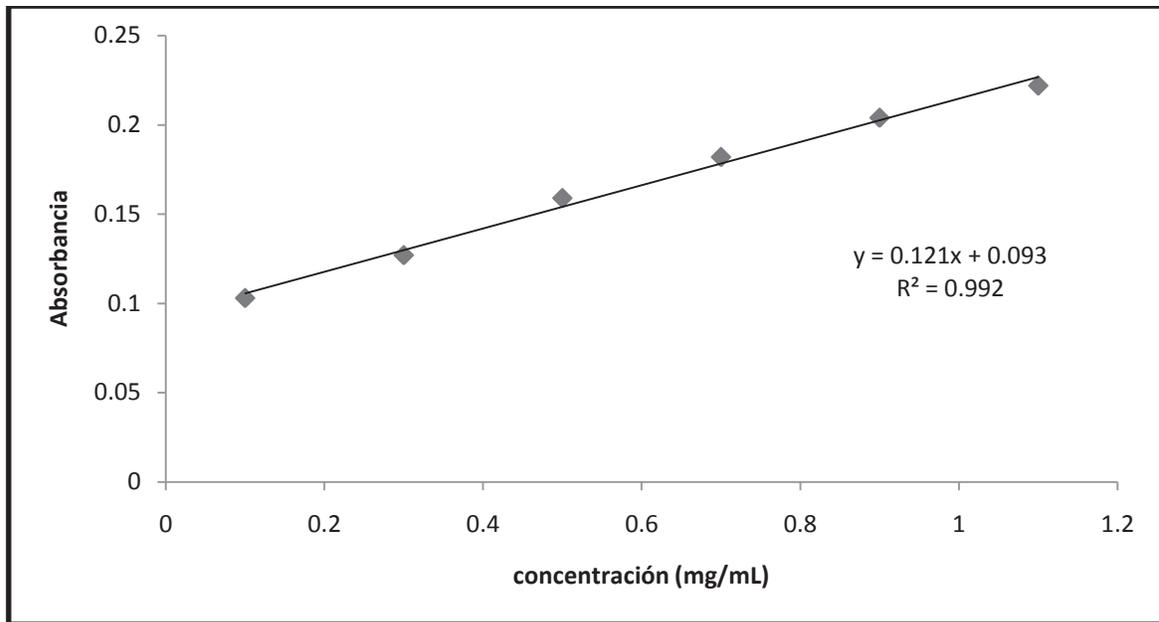


Fig. A-1. Curva de calibración de fructuosa para concentraciones mínimas.

La segunda curva que se hizo fue a concentraciones de la solución estándar con valor de 0.9, 1.8, 2.7, 3.6, 4.5, 5.4, 6.3, 7.0, 8.1 y 9 mg/mL. (Fig. A-2):

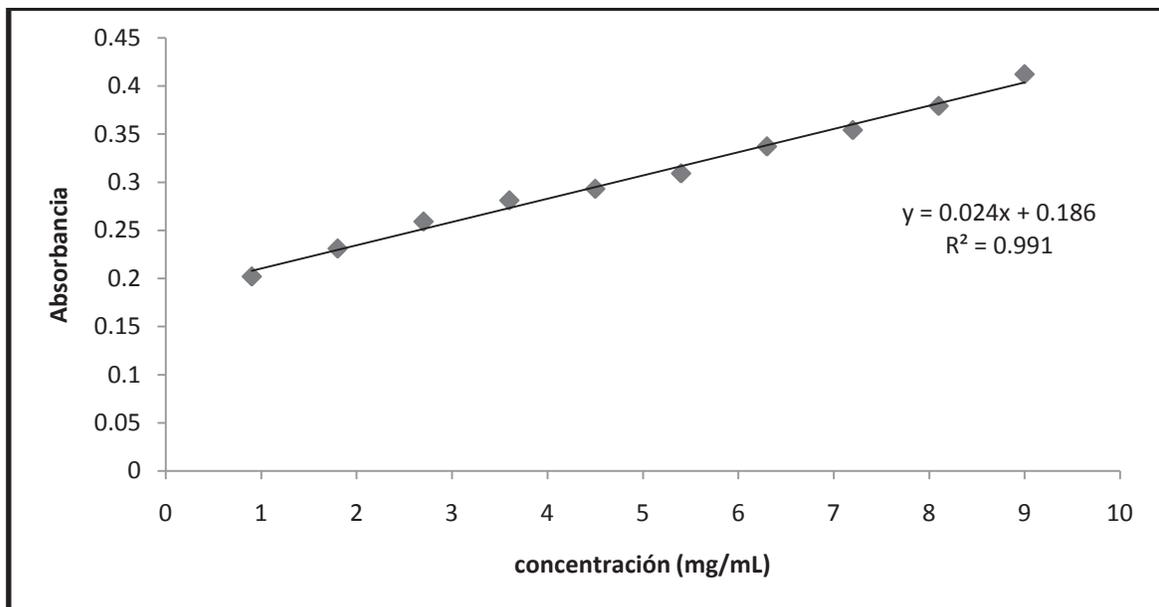


Fig. A-2. Curva de calibración de fructuosa.

Y finalmente la tercera curva de calibración, fue con concentraciones máximas de la solución estándar que nosotros consideramos que serían las concentraciones máximas, estas concentraciones fueron de 1.8, 3.6, 5.4, 7.2, 9, 10.8, 12.6 mg/mL (Fig. A-3.):

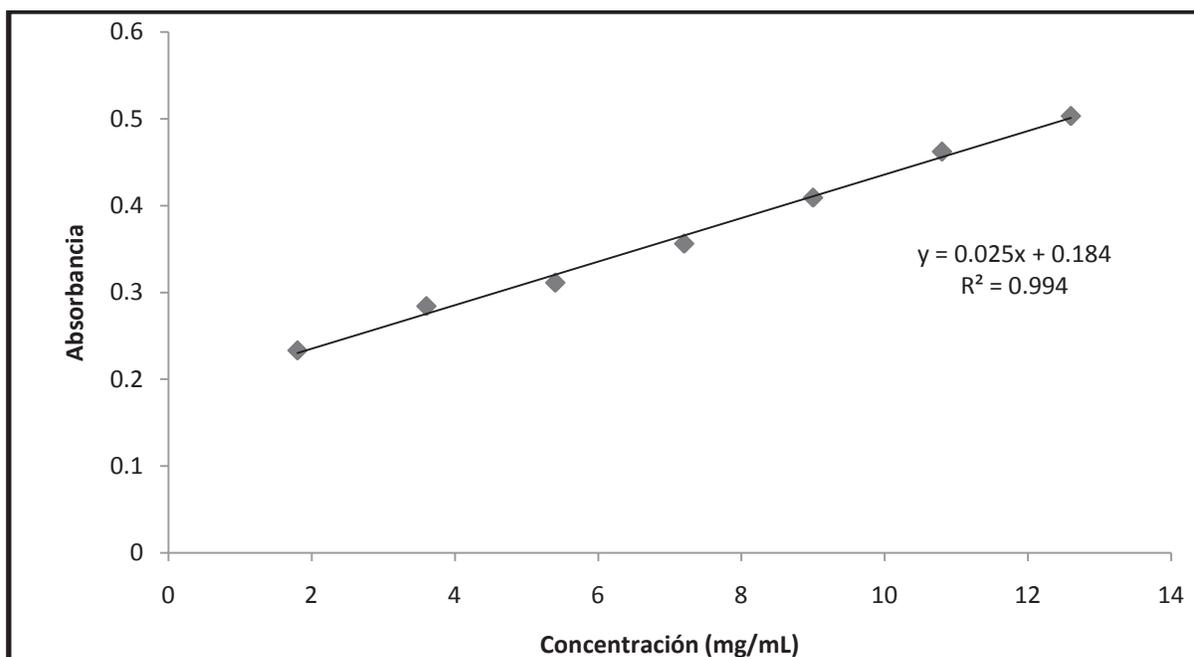


Fig. A-3. Curva de calibración de fructuosa para concentraciones máximas.

Estas soluciones estándar se corrieron por triplicado, las curvas que se elaboraron se hicieron con el promedio de las tres lecturas dadas para cada solución (ver tabla A-2.).

Tabla A-2: Concentración y Absorbancia de las tres soluciones estándar.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
0.1	0,103	0.9	0,202	1.8	0,233
0.3	0,127	1.8	0,231	3.6	0,284
0.5	0,159	2.7	0,259	5.4	0,311
0.7	0,182	3.6	0,281	7.2	0,356
0.9	0,204	4.5	0,293	9.0	0,409
1.1	0,222	5.4	0,309	10.8	0,462
		6.3	0,337	12.6	0,503
		7.2	0,354		
		8.1	0,379		
		9.0	0,412		

Dada la relación de absorbancia vs concentración obtenemos el comportamiento de los gráficos con un coeficiente de correlación r^2 de 0.992 para el primer gráfico, 0.991 para el segundo, y 0.994 para el tercer gráfico respectivamente.

Siguiendo con el procedimiento de validación, los valores de Sy/x ; así como los valores de Sb , y Sa que son las desviaciones estándar para la pendiente b y la ordenada al origen a. Los límites de confianza están dados por $b \pm tSb$ y $a \pm tSa$ donde el valor de t varía dependiendo del nivel de confianza, q en este caso se fija para un 95%, en la tabla A-3 se muestran los valores de cada gráfico.

Tabla A-3. Valores tabulados para los límites de confianza

	Sy/x	b	Sb	Lim d conf $b \pm tSb$	a	Sa	Lim d conf $a \pm tSa$
Curva 1	0.005	0.12	0.006	± 0.02	0.09	0.004	± 0.01
Curva 2	0.0087	0.02	0.0011	$\pm < 0.00$	0.19	0.006	± 0.02
Curva 3	0.0089	0.03	0.0009	$\pm < 0.00$	0.18	0.008	± 0.02

Los resultados de la validación del método del DNS se encuentran tabulados en la siguiente tabla(Tabla A-4.):

Tabla A-4. Resultados de la validación para el ácido dinitrosalicílico (DNS).

PARÁMETRO	MAGNITUD
% de recobro	90
Desviación estándar relativa	5.25%
Límite de detección	0.12 mg/ml
Límite de cuantificación	0.41 mg/ml
Especificidad	Longitud de onda característica: 550nm

A.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Solución de cloruro de sodio 150 mM

Disolver 0.87 g de cloruro de sodio (0.15 M) en 100 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

Solución stock Bradford

Mezclar 10 mL de etanol al 95 %, 20 mL de ácido fosfórico al 88 % y 35 mg (0.035 g) de azul brillante de Coomassie G-250. Almacenar en frasco ámbar. Esta solución es estable indefinidamente a temperatura ambiente.

Solución de trabajo Bradford

Mezclar 42.5 mL de agua destilada, 1.5 mL de etanol al 95%, 3.0 mL de ácido fosfórico al 88 % y 3.0 mL de la solución stock Bradford. Después filtrar en papel filtro (Whatman No.1) y almacenar a 4°C en un frasco ámbar. Estable por un par de meses, luego debe ser filtrada nuevamente, para su uso.

Curva patrón de proteína

Procedimiento:

- 1) Preparar una solución estándar de albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg por mililitro, pesar .01 g (10 mg) de ésta proteína y disolver en 10 mL de NaCl 150 mM; hacer alícuotas de 1 mL y almacenar a -20 °C, para su posterior uso.
- 2) Colocar en una serie de tubos eppendorf, diferentes concentraciones de la solución estándar de proteína, adicionando el NaCl 150 mM (0.15 M) necesario para tener un volumen de 800 µL, como se muestra en la tabla (hacer por triplicado).

Tabla A.5. Detalle de valores para realizar la curva patrón de proteínas.

No. de tubo	Cloruro de sodio 0.15 M	Stock de albúmina (1mg/mL)	Concentración final de proteína
0 (blanco)	800 μL	0 μL	0 μg
1	799 μL	1 μL	1 μg
2	795 μL	5 μL	5 μg
3	790 μL	10 μL	10 μg
4	785 μL	15 μL	15 μg
5	780 μL	20 μL	20 μg
6	775 μL	25 μL	25 μg
7	770 μL	30 μL	30 μg
8	765 μL	35 μL	35 μg
9	760 μL	40 μL	40 μg
10	755 μL	45 μL	45 μg

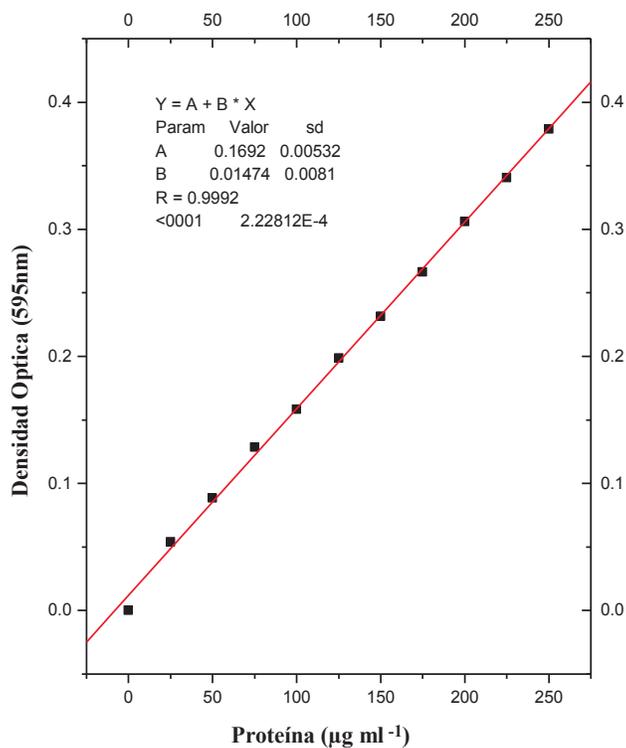


Fig. A-4. Curva patrón de albúmina sérica bovina

- 3) Adicionar a cada tubo 200 μL de la solución de trabajo Bradford para tener un volumen final de 1 mL, luego mezclar empleando el vórtex (vortexear).
- 4) Dejar reposar durante 3 minutos.
- 5) Después ajustar a cero con el blanco y leer la absorbancia en luz visible a una longitud de onda de 595 nm. Graficar la densidad óptica versus la concentración de proteína. Después interpolar la densidad óptica obtenida de la muestra problema en la gráfica ó hacer los siguientes cálculos utilizando la ecuación de una recta. Por ejemplo, si la densidad óptica fue de 0.209, este valor hay que sustituirlo en la siguiente fórmula: $Y = a + bx$; despejando nos quedaría que $x = (y - a) / b$; luego sustituyendo los valores obtenidos a partir de una regresión lineal de los valores de la curva patrón por el método de mínimos cuadrados, tendríamos $0.209 - 0.1692 / 0.01474 = 2.7$, luego dividir este resultado entre la dilución si es que la hay. Ej: $2.7 / 5$ que son los microlitros de la muestra problema, nos daría 0.54 μg de proteína por microlitro, y por último se calcula la concentración total de proteína por mililitro de muestra, la cual para este caso sería de $540 \mu\text{g} / \text{mL} = 0.54 \text{ mg/mL}$.

A.3. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS

Curva patrón de Fructuosa

Se prepara la solución estándar de fructuosa de 50 $\mu\text{moles/mL}$. Para esto se pesan 2.25 g de dextrosa y se disuelven en 250 mL de agua destilada.

Se colocan en una serie de tubos, diferentes concentraciones de la solución estándar del azúcar, adicionando el agua necesaria para tener un volumen final de 2 mL, como se muestra en la tabla A-6.

Tabla A-6. Preparación de la curva de calibración de fructuosa

No. DE TUBO	AGUA DESTILADA (mL)	STOCK DE FRUCTUOSA (mL)	CONCENTRACION (μ moles fructuosa/mL)	CONCENTRACION FINAL mg de fructuosa
0 (blanco)	2.0	0.0	0	0.0
1	1,8	0.2	5	0.9
2	1,6	0.4	10	1.8
3	1.4	0.6	15	2.7
4	1.2	0.8	20	3.6
5	1.0	1.0	25	4.5
6	0.8	1.2	30	5.4
7	0.6	1.4	35	6.3
8	0.4	1.6	40	7.2
9	0.2	1.8	45	8.1
10	0.0	2.0	50	9.0

Se adicionan 3 mL del reactivo de DNS, se agitan en un vórtex y se ponen a hervir por 5 min en un baño maría.

Se adicionan 15 mL de agua destilada y se leen en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.

Se gráfica Absorbancia. Vs. Concentración del azúcar.

Preparación de solución de Carboximetilcelulosa.

Se pesan 0.75 g de carboximetilcelulosa (CMC, sal de sodio) y se disuelven en 100 mL de Buffer acetatos de sodio de 0.1 M y pH 5.5. Agitar por 30 min a una temperatura de 50°C.

Curva patrón de carboximetilcelulosa (CMC)

Procedimiento:

- 1) Preparar una solución estándar de CMC de 5 $\mu\text{moles} / \text{mL}$ (Pesar 0.067g de carboximetilcelulosa y disolver en 100 mL de agua destilada).
- 2) Colocar en una serie de tubos, diferentes concentraciones de la solución estándar del azúcar, adicionando el agua necesaria para tener un volumen final de 2 mL. (hacer por triplicado).
- 3) Adicionar 3 mL del reactivo de DNS, vortexear y hervir por 5 min en baño María.
- 4) Adicionar 15 mL de agua destilada y leer a una D.O. de 550 nm. Graficar D.O. vs. Concentración de la enzima.

Interpolar la D.O. obtenida en la gráfica ó hacer los siguientes cálculos para las celulasas: $Y = a + bx$; $x = (y - a) / b = (\text{D.O.}_{550\text{nm}}) - (-0.01237483) / 0.098095236 = X^1 / \mu\text{L}$ de alícuota = X^2 / min de reacción = X^3 (Unidades) = $\mu\text{moles liberados de producto} \cdot \text{mL}^{-1}$ de filtrado $\cdot \text{min}^{-1}$.

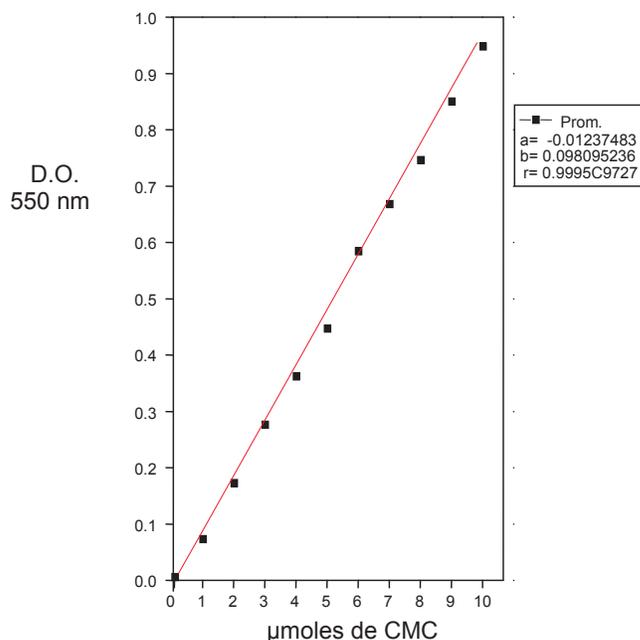


Fig. A-5. Curva estándar de Carboximetil Celulosa

Curva patrón de xilosa

Procedimiento:

- 1) Preparar una solución estándar de xilosa de 5 $\mu\text{moles/ mL}$ (Pesar 0.075g de xilosa y disolver en 100 mL de agua destilada).
- 2) Colocar en una serie de tubos, diferentes concentraciones de la solución estándar del azúcar, adicionando el agua necesaria para tener un volumen final de 2 mL (hacer por triplicado).
- 3) Adicionar 3mL del reactivo de DNS, vortexear y hervir por 5 min en baño María.
- 4) Adicionar 15 mL de agua destilada y leer a una D.O. de 550 nm. Graficar D.O. vs. Concentración de la enzima.

Interpolar la D.O. obtenida en la gráfica ó hacer los siguientes cálculos para las xilanasas: $Y = a + bx$; $x = (y - a) / b = (\text{D.O.}_{550\text{nm}}) - (-0.02126) / 0.0970848 = X^1 / \mu\text{L}$ de alícuota = $X^2 / \text{min de reacción} = X^3 (\text{Unidades}) = \mu\text{moles liberados de producto} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ de filtrado} \cdot \text{min}^{-1}$.

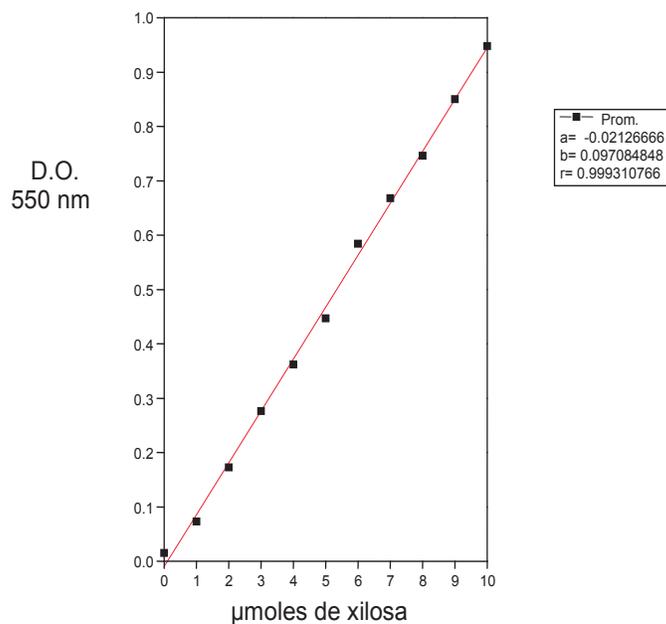


Fig. A-6. Curva estándar de Xilosa

A.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD K_M PARA LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LAS DIFERENTES ENZIMAS ESTUDIADAS.

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente en otras formas que son más útiles para la expresión de los datos experimentales. Una de las transformaciones más usadas se obtiene tomando los recíprocos de ambos miembros de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad E. c. (A. 1)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{m\acute{a}x}[S]} \quad E. c. (A. 2)$$

Reordenando, tenemos:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}[S]} \quad E. c (A. 3)$$

Que se reduce a:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} ; y = mx + b \quad E. c (A. 4)$$

La ecuación (A.4) es la ecuación de Lineweaver-Burk. Esta ecuación se comporta como una línea recta y facilita el cálculo de K_M .

4.1. Cálculo de la constante de velocidad K_M para cada una de las enzimas estudiadas

Tabla A.7. Datos para la Determinación de la Velocidad de reacción para Inulinasas

Actividad ($\mu\text{mol/mL min}$)	tiempo (h)	Concentración (mol/L)	velocidad	1/v	1/s
1	0	0	0.06	16.6666667	---
1.123	6	0.40428	0.06738	14.8411992	2.47353319
1.487	12	1.07064	0.08922	11.2082493	0.93402077
2.254	18	2.43432	0.13524	7.39426205	0.41079234
4.329	24	6.23376	0.25974	3.85000385	0.16041683
4.657	30	8.3826	0.27942	3.57884189	0.11929473
4.738	36	10.23408	0.28428	3.51765865	0.09771274
4.875	42	12.285	0.2925	3.41880342	0.08140008
4.952	48	14.26176	0.29712	3.36564351	0.07011757
		Vmax	0.271916467		
		Km	1.360642811		

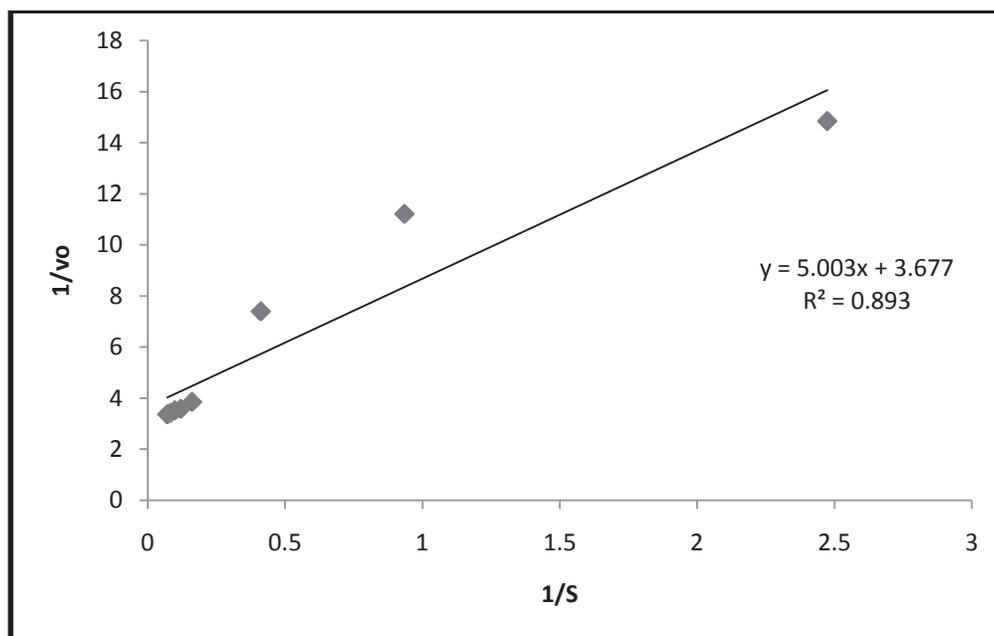


Fig. A.7. Obtención de la constante de velocidad para inulinasas.

Tabla A.8. Datos para la Determinación de la Velocidad de reacción para Celulasas

Actividad ($\mu\text{mol/mL min}$)	tiempo (h)	Concentración (mol/L)	velocidad	1/v	1/s
0	0	0	0	---	---
0.458	6	0.16488	0.02748	36.3901019	6.06501698
0.671	12	0.48312	0.04026	24.8385494	2.06987912
0.984	18	1.06272	0.05904	16.9376694	0.94098163
1.546	24	2.22624	0.09276	10.7805088	0.44918787
1.743	30	3.1374	0.10458	9.56205775	0.31873526
1.738	36	3.75408	0.10428	9.58956655	0.26637685
1.722	42	4.33944	0.10332	9.67866822	0.23044448
1.708	48	4.91904	0.10248	9.75800156	0.2032917
		Vmax	0.10286161		
		Km	0.485445082		

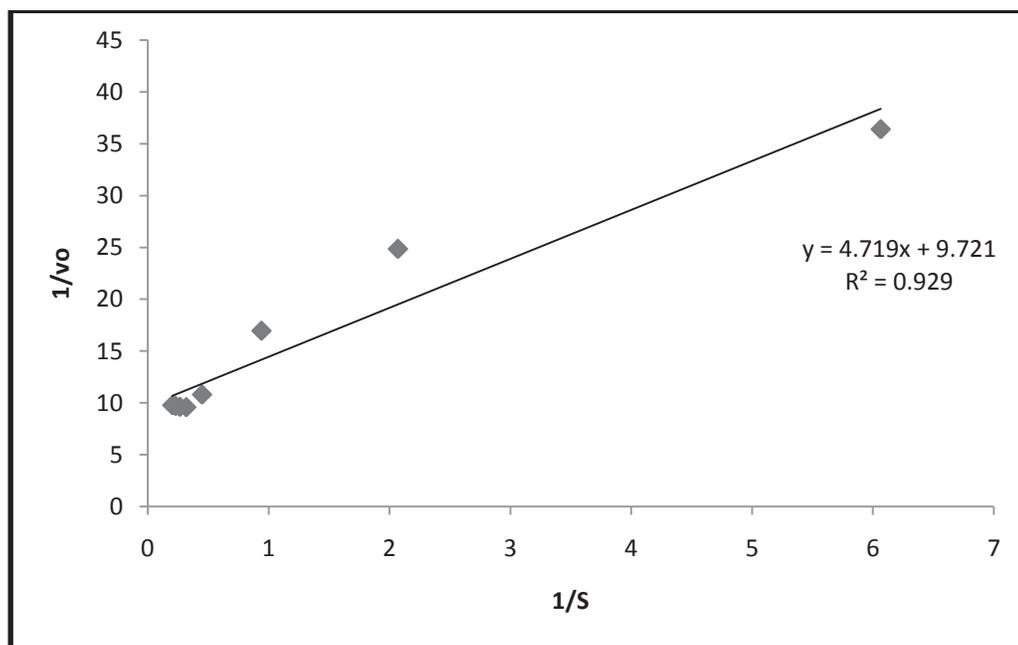


Fig. A.8. Obtención de la constante de velocidad para celulasas.

Tabla A.9. Datos para la Determinación de la Velocidad de reacción para Xilanasas

Actividad ($\mu\text{mol/mL min}$)	tiempo (h)	Concentración (mol/L)	velocidad	1/v	1/s
0	0	0	0	---	---
0.438	6	0.15768	0.02628	38.0517504	6.3419584
1.256	12	0.90432	0.07536	13.2696391	1.10580326
1.728	18	1.86624	0.10368	9.64506173	0.53583676
3.45	24	4.968	0.207	4.83091787	0.20128824
3.571	30	6.4278	0.21426	4.66722673	0.15557422
3.623	36	7.82568	0.21738	4.60023921	0.12778442
3.219	42	8.11188	0.19314	5.17759138	0.12327599
2.887	48	8.31456	0.17322	5.77300543	0.12027095
		Vmax	0.200296439		
		Km	1.059327805		

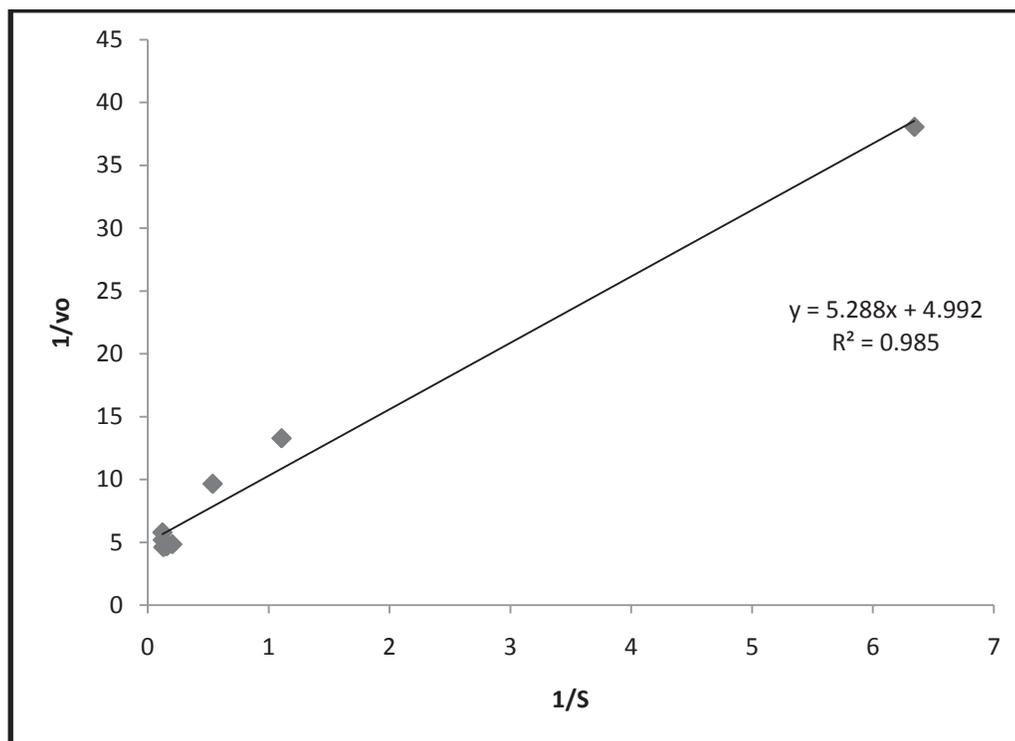


Fig. A.9. Obtención de la constante de velocidad para xilanasas.

Tabla A.10. Datos para la Determinación de la Velocidad de reacción para Pectinasas

Actividad ($\mu\text{mol/mL min}$)	tiempo (h)	Concentración (mol/L)	velocidad	1/v	1/s
0	0	0	0	---	---
0.275	6	0.099	0.0165	60.6060606	10.1010101
0.469	12	0.33768	0.02814	35.5366027	2.96138356
0.685	18	0.7398	0.0411	24.3309002	1.35171668
1.297	24	1.86768	0.07782	12.8501671	0.53542363
1.596	30	2.8728	0.09576	10.4427736	0.34809245
1.645	36	3.5532	0.0987	10.1317123	0.28143645
1.532	42	3.86064	0.09192	10.8790252	0.25902441
1.382	48	3.98016	0.08292	12.0598167	0.25124618
		Vmax	0.084645336		
		Km	0.433104791		

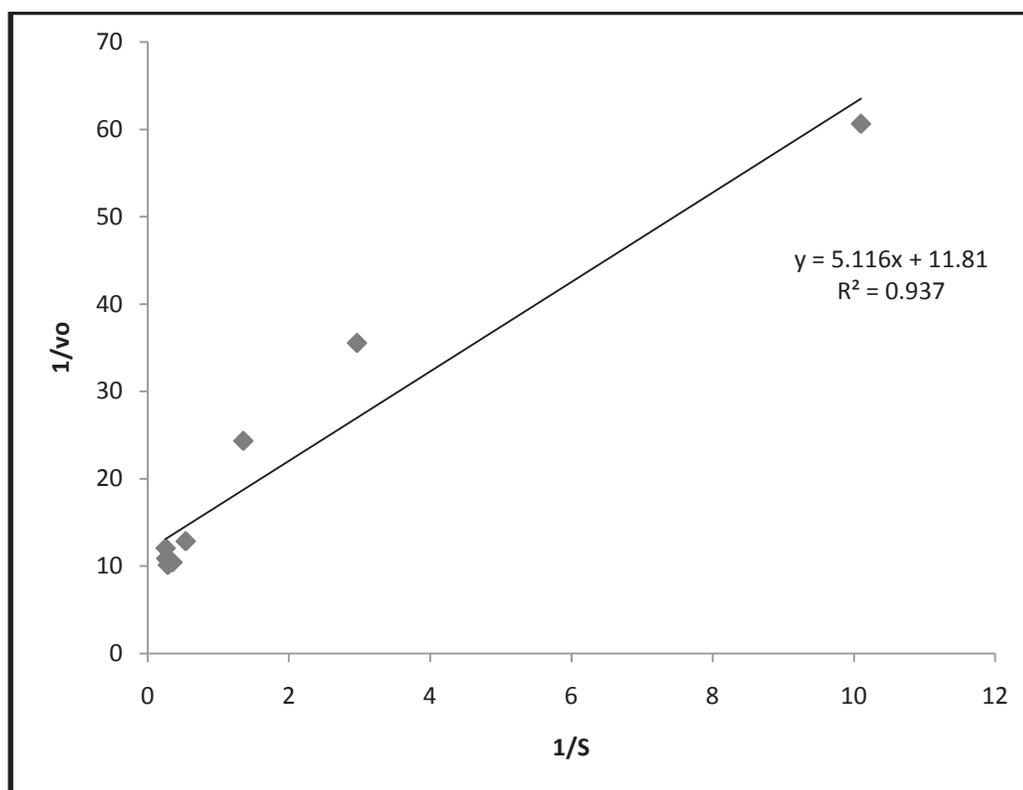


Fig. A.10. Obtención de la constante de velocidad para pectinasas.

A.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LA LEVADURA *SACCHAROMYCES CEREVISAE*.

Primeramente, se hace la suposición de que la cinética que se seguirá será la descrita para crecimiento microbiano:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Ec. (A.5)}$$

Donde:

x: Biomasa (g / l)

μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t: Tiempo (h)

Reacomodando la ecuación A.5., obtenemos:

$$\frac{dx}{x} = \mu dt \quad \text{Ec. (A.6)}$$

Integrando la ecuación (A.6) desde $t = 0$, cuando $[x] = [x]_0$, hasta t; tenemos:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \mu \int_0^t dt \quad \text{Ec. (A.7)}$$

O bien:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad \text{Ec. (A.8)}$$

Reacomodando la ecuación (A.8):

$$\ln x - \ln x_0 = \mu t \quad \text{Ec. (A.9)}$$

Siguiendo la forma de una línea recta de la forma:

$$y = mx + b$$

$$\ln x = -\mu t + \ln x_0 \quad \text{Ec. (A.10)}$$

Esta es la ecuación para la determinación de la velocidad específica de crecimiento de levaduras de datos experimentales.

Tabla A.11. Datos para la determinación de la velocidad de levaduras

tiempo	concentración	% viabilidad	ln c
6	6,754	1.69	8.817890201
12	45,675	1.83	10.72930638
18	61,780	1.87	11.03133497
	μ (h ⁻¹)	0.1845	

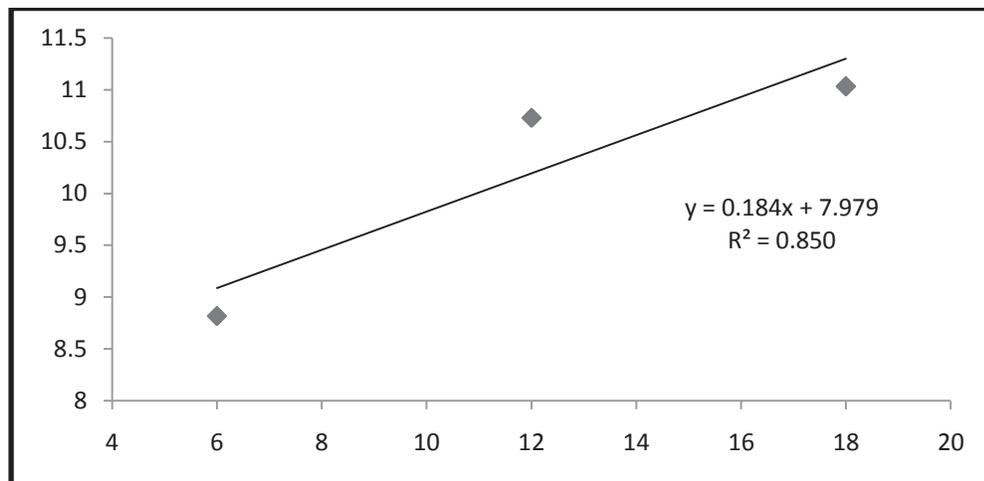


Fig. A.11. Constante de crecimiento de levaduras

A.6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEZCAL.

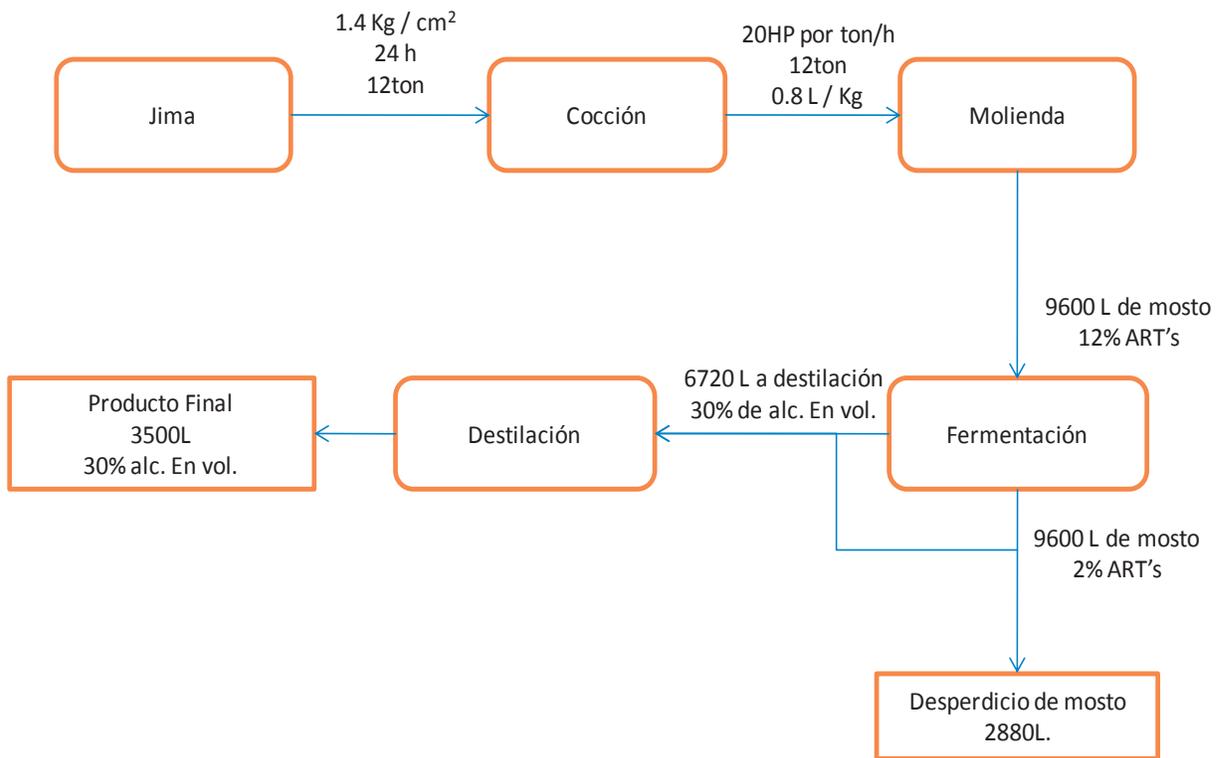


Fig. A.12. Diagrama de Flujo del Proceso de Obtención del Mezcal.