

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

**“CARACTERIZACIÓN Y EFICIENCIA DE LA FERMENTACION EN LA
ELABORACION DEL MEZCAL POTOSINO”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

ING. CÉSAR IVÁN GODÍNEZ HERNÁNDEZ

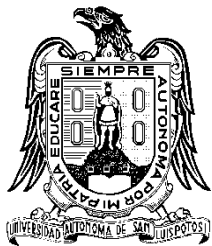
DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

ASESORES:

DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA

M.C. ROSA ELENA DELGADO PORTALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTADES DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

“CARACTERIZACIÓN Y EFICIENCIA DE LA FERMENTACIÓN EN LA ELABORACIÓN DEL MEZCAL POTOSINO”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

ING. CÉSAR IVÁN GODÍNEZ HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTORA: DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES _____

ASESOR: DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA _____

ASESOR: M.C. ROSA ELENA DELGADO PORTALES _____

SINODALES:

PRESIDENTE: DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES _____

SECRETARIO: DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA _____

VOCAL: DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS _____

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

CON FINANCIAMIENTO DE:

FUNDACION PRODUCE 2010

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**“EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN
DE MEZCAL”**

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 289510

FAI-11-42.78

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

AGRADECIMIENTOS

Tras tres años de esfuerzo que quedan plasmados en esta tesis, no queda más que agradecer a aquellas personas que tanto me han ayudado y apoyado en el transcurso de este trabajo que parece estar llegando a su final.

Primeramente quiero agradecer a los miembros de mi comité tutelar. A la Dra. Bertha Irene Juárez Flores por confiar en mí hace tres años, para trabajar en el proyecto, y por brindarme su tiempo y apoyo en cada una de las etapas de la presente tesis. Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera por sus enseñanzas, sabios consejos, sugerencias, críticas y por sus atinados comentarios que me sirvieron en todo momento, a la M. C. Rosa Elena Delgado Portales, por su apoyo, disposición y amistad.

A mis compañeros de generación Carmen, Chío, Ángeles, Lili, Julio, David y Octavio, que me hicieron pasar buenos momentos y con quienes hice una bonita amistad.

A mis compañeros de laboratorio en especial a Cynthia, por su amistad, apoyo y compartir sus conocimientos, a Desiré, Carlos y Montse por su apoyo como prestadores de servicio social.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP por brindarme los espacios, vehículos, etc. por cobijarme en su seno y permitirme conocer los quehaceres de la investigación.

Al personal del IIZD Roxana, Marilú, Alberto, Yureida, Paty, Jaime, Juan Miguel y Fernando que siempre me ayudaron, en especial a don Enrique por su franqueza, a don Mauricio y a don Manuel por su amabilidad y apoyo cuando lo necesité, a Josefina Acosta, por su calidad humana y apoyo técnico al igual que Q. Ma. del Socorro Jasso Espino.

Al Sr. Pablo Díaz del Castillo por su disposición para el desarrollo del proyecto en la fábrica de mezcal Laguna Seca, a los trabajadores de la fábrica de mezcal principalmente a Manuel, don Pancho "Pipo", Lidio y de la misma manera a los cargadores y a los trabajadores del corte y la molienda, que me ayudaron en las visitas a la fábrica de mezcal y campo.

A la Q.F.B. Sara Delgado Portales del laboratorio de inmunología de la Facultad de Medicina de la UASLP, por facilitarme los suficientes tubos cónicos para los muestreos; al Dr. Ramón F. García por facilitarme una incubadora con agitación para la propagación de los caldos de fermento.

A mi gran amigo Juan Miguel Guerrero Calderón, por su grande amistad y apoyo cuando lo he necesitado.

A mi familia por su amor, comprensión y apoyo incondicional, y sobre todo porque han estado en los momentos más felices y difíciles de mí vida.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible este trabajo.

Muchas Gracias

Dedicatoria

A Dios, por permitirme concluir una etapa más en mi vida.

A mis padres José Ángel y Antonia,
y hermanos Paty, Luis, Néstor, Alán y Lorena.

A Gabriela Selene Peña Avelino por estar a mi lado.

Índice general

Índice general	i
Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iii
Resumen general	1
1. Introducción	2
1.1 Bibliografía	6
2. Antecedentes	8
2.1 Generalidades de los magueyes	8
2.1.1 Metabolismo CAM.....	10
2.1.2 Compuestos del maguey.....	11
2.1.2.1 Fructanos	11
2.1.2.2 Saponinas.....	13
2.1.3 Usos del maguey	13
2.1.4 <i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dick.....	15
2.2 Bebidas alcohólicas.....	16
2.2.1 Clasificación de las bebidas alcohólicas	17
2.2.2 Mezcal	17
2.2.3 Proceso de elaboración de mezcal en la fábrica Laguna Seca.....	18
2.2.3.1 Selección de la materia prima y recolección	19
2.2.3.2 Cocción	20
2.2.3.3 Molienda o extracción de jugos	21
2.2.3.4 Fermentación de jugos	22
2.2.3.5 Destilación	24
2.3 Fermentación	24
2.4 Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	25
2.4.1 Factores de crecimiento	27
2.4.1.1 Fuente de carbono	27
2.4.1.2 Fuente de nitrógeno	27
2.4.1.3 Oxígeno.....	28
2.4.1.4 Macro y micronutrientes	28
2.4.1.5 Vitaminas	29
2.4.2 Metabolismo energético de la levadura	29
2.4.2.1 Glucólisis.....	29
2.4.2.2 Fermentación alcohólica.....	30

2.4.3	Influencia del microambiente	31
2.4.3.1	Temperatura	32
2.4.3.2	pH	32
2.4.3.3	Factores de estrés	32
2.4.3.4	Inhibidores de la fermentación	33
2.3.3.4.1	<i>Etanol</i>	33
2.3.3.4.2	<i>Dióxido de carbono (CO₂)</i>	33
2.3.3.4.3	<i>Saponinas</i>	34
2.4.4	Productos metabólicos de la fermentación alcohólica	34
2.4.4.1	Producción de alcoholes superiores	35
2.4.4.2	Ácidos orgánicos	35
2.4.4.3	Ésteres	36
2.4.4.4	Aldehídos y cetonas	36
2.4.4.5	Compuestos azufrados	37
2.5	Señalamientos conclusivos	37
2.6	Bibliografía	39
3.	Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca”	45
	Resumen	45
3.1	Introducción	47
3.1.1	Materia prima y condiciones de fermentación en la fábrica de mezcal “Laguna Seca”	48
3.1.2	Épocas o estaciones funcionales en relación con el maguey (<i>Agave salmiana</i>)	53
3.2	Materiales y métodos	54
3.2.1	Obtención de muestras	55
3.2.2	Análisis estadísticos	57
3.3	Resultados y discusión	57
3.3.1	Reactivación del caldo microbiano (“pie de cuba” o tambo)	58
3.3.2	Propagación del caldo microbiano (“preinóculo” o cajón)	62
3.3.3	Fermentación alcohólica	65
3.4	Conclusiones	77
3.5	Bibliografía	79
	Apéndice I	83
	Apéndice II	87

Índice de cuadros

Cuadro 2. 1 Clasificación de las bebidas alcohólicas (Aguirre, 2009).	17
Cuadro 2. 2 Aminoácidos para la producción de alcoholes superiores (Leveau y Bouix, 2000).	35
Cuadro 3. 1 Métodos analíticos para la cuantificación de las variables evaluadas.	57
Cuadro 3. 2 Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal Laguna Seca en dos épocas funcionales del año.	67
Cuadro 3. 3 Análisis de correlación de las cuantificaciones de azúcares fermentables por CLAP con las mediciones con refractómetro digital.	70
Cuadro 3. 4 Composición relativa y absoluta de AF al inicio y al término de la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	74
Cuadro 3. 5 Rendimiento absoluto y relativo de etanol estimado por lote procesado con base en el volumen de mezcal destilado en la fábrica Laguna Seca en dos épocas funcionales del año.	76

Índice de figuras

Fig. 2. 1 Distribución de especies de maguey en México y en San Luis Potosí (tomado de ©Conabio, 2005).	8
Fig. 2. 2 Distintos usos del maguey.	15
Fig. 2. 3 Maguey mezcalero potosino (<i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dick).	16
Fig. 2. 4 Proceso de elaboración de mezcal potosino.	19
Fig. 2. 5 Selección, desvire y tumba de maguey mezcalero potosino.	20
Fig. 2. 6 Llenado de hornos de mampostería en la región del altiplano potosino.	21
Fig. 2. 7 Extracción del jugo de las cabezas de maguey cocido.	22
Fig. 2. 8 Cámara y pila de fermentación.	23
Fig. 2. 9 Equipo de destilación fraccionada (alambique de cobre, refinador y condensación).	24
Fig. 2. 10 Metabolismo energético ambivalente de la especie <i>S. cerevisiae</i> (Walker, 1998).	26
Fig. 2. 11 Reacción de la fermentación alcohólica (Mathews y Van Holde, 1998).	30

Fig. 2. 12 Metabolismo aerobio y anaerobio de <i>S. cerevisiae</i> (Walker, 1998).	31
Fig. 3. 1 Características del corte transversal basal del cogollo de <i>Agave salmiana</i> : a) maguey recién castrado; b) maguey quietillo, con pocas pencas sin desplegar y el hueco del meristemo del quiote; c) maguey desquietado por depredación; d) maguey bruto, con abundantes pencas sin desplegar y el ápice vegetativo persistente.	50
Fig. 3. 2 Desarrollo del caldo microbiano para la fermentación alcohólica, de acuerdo con el personal técnico de la fábrica de mezcal Laguna Seca.....	52
Fig. 3. 3 Fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca”, Charcas, S L P (Fot.: Anónimo, 2009).	55
Fig. 3. 4 Dispositivo para el muestreo simultáneo en tres profundidades de la pila con jugos en fermentación alcohólica.	56
Fig. 3. 5 Variación de la temperatura durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	59
Fig. 3. 6 Variación de la reacción durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	60
Fig. 3. 7 Consumo de AF durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	62
Fig. 3. 8 Consumo de fructosa durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	63
Fig. 3. 9 Consumo de glucosa durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	63
Fig. 3. 10 Variación de la densidad microbiana (levaduras) en escala logarítmica durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.	64
Fig. 3. 11 Variación de la temperatura durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.	64
Fig. 3. 12 Variación de la reacción durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.	65

Fig. 3. 13 Consumo de AF durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.	65
Fig. 3. 14 Densidad microbiana en escala logarítmica durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.....	66
Fig. 3. 15 Variación de la temperatura durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	68
Fig. 3. 16 Variación de la reacción durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	69
Fig. 3. 17 Consumo de AF durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	69
Fig. 3. 18 Variación en las mediciones de °Brix y de AF por CLAP, durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	70
Fig. 3. 19 Regresión de °Brix medidos con refractómetro digital sobre las cuantificaciones de AF por CLAP; a) época lluviosa; b) época fría.	71
Fig. 3. 20 Densidad microbiana en escala logarítmica durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.	73

Resumen general

El maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick) es un recurso natural renovable que crece de manera silvestre en el altiplano potosino, y se ha utilizado por mucho tiempo como materia prima para la elaboración de mezcal, siendo ésta, la actual y principal forma de aprovechamiento. En la región la industria mezcalera ha sido de gran importancia económica para las poblaciones rurales, ya que el maguey es de los pocos recursos bióticos abundantes y disponibles en la región; sin embargo, el bajo costo que se paga por el recurso, enmascara la necesidad de mejorar la eficiencia de sus formas de aprovechamiento (mezcal). Particularmente la fábrica de mezcal “Laguna Seca”, representativa de la región, es de las pocas que trabajan de manera continua y a una quinta parte de su capacidad instalada. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar el estado actual de la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal potosino mediante la evaluación de las diferentes variables; temperatura, pH, azúcares fermentables AF (fructosa y glucosa), densidad celular, nitrógeno y etanol en dependencia de la época del año (época lluviosa y época fría). Esta información es necesaria para entender las relación e implicación del efecto de ciertos factores en el rendimiento y la calidad del destilado; al mismo tiempo, determinante para la estandarización tanto del proceso como del producto. A la vez, conforma la base para el desarrollo de fermentaciones experimentales en laboratorio. En general la época funcional influyó significativamente en el pH y contenido de AF de los jugos frescos, y en la temperatura de la cámara de fermentación. Se carece de control de la temperatura y de la adición de nitrógeno durante la reactivación y propagación del fermento. Por lo general en la época fría, antes iniciar la fermentación los jugos se calientan con vapor si su temperatura es menor a 30 °C. La concentración ajustada de AF al inicio de la fermentación y el porcentaje de consumo de AF por las poblaciones microbianas es menor a lo registrado para tequila. El mayor consumo de AF por la población microbiana ocurrió entre las 3 y 18 h de fermentación y correspondió a la fructosa, pues la glucosa prácticamente quedó sin cambio al final de la fermentación.

1. Introducción

El maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick) es un recurso natural renovable que crece de manera silvestre (Bazant, 1980; Pérez, 1997; Aguirre *et al.*, 2001) en el altiplano potosino zacatecano. Este maguey al igual que nopal y mezquite destacan por su abundancia en la vegetación natural de la región, y estos tres grupos de plantas representan una fuente importante de recursos para el sector campesino, pues su aprovechamiento y manejo forman parte de la economía familiar (Aguirre *et al.*, 2001; Carrillo, 2007).

La utilización de *A. salmiana* en la región ha sido muy diversa desde tiempos inmemoriales; no obstante, su uso como materia prima para la producción de aguardiente surge después de la conquista, con la introducción clandestina del alambique filipino y la destilación de la bebida prehispánica llamada “vino mezcal” (Tello y García, 1985; Aguirre *et al.*, 2001). Este aguardiente se obtiene de la fermentación y destilación de jugos azucarados extraídos de cabezas (tallo y base de pencas) cocidas de magueyes maduros y nativos de regiones áridas y semiáridas de México (Payno, 1864; Pérez, 1997; Aguirre *et al.*, 2001). Su producción comenzó a tener importancia cuando se incorpora a los grandes complejos agroindustriales o haciendas de la nueva España; este esquema de producción se difundió en el altiplano potosino por la disponibilidad de maguey silvestre, a tal grado que el estado de San Luis Potosí fuera uno de los principales productores de mezcal a mediados del siglo XIX (Payno, 1864).

Probablemente el auge de la producción de mezcal en el altiplano potosino se debió, a la concordancia en su territorio de las condiciones ambientales propias del recurso biológico y el establecimiento de fábricas de mezcal diseñadas con un cierto enfoque industrial (Gschaedler, 2007). Este aguardiente de maguey constituyó por más de un siglo uno de los productos mercantiles de las haciendas, que por su volumen de producción y valor económico comerciaban en Guanajuato, Zacatecas y estados mineros del norte de México (Payno, 1864).

La Revolución y el reparto de tierras a principios del siglo XX, ocasionó que la mayoría de las fábricas de mezcal quedaran desarticuladas en sus fuentes de abastecimiento de

materia prima. Esta debilidad se sumó a las nuevas tendencias de consumo de cerveza y ron de caña (Aguirre, 2009), agravándose cada vez más su demanda hasta los años setenta, a tal grado que las pocas fábricas que se mantuvieron de manera muy marginal, colapsaron hasta llegar a la quiebra e inoperancia en su mayoría (Bazant, 1980; Aguirre, 2009).

En los años noventa pocas fábricas de mezcal reiniciaron operaciones, tratando de instaurar la producción de mezcal, y que hasta la fecha trabajan a un nivel menor de su capacidad instalada y con problemas de eficiencia en el proceso en general “por la pérdida de calidad, precios y mercados, cambios en las modas y gustos, y deterioro del conocimiento tradicional sobre el manejo de magueyeras y proceso de fabricación del mezcal” (Aguirre, 2009: 9). Esta problemática tal vez se deba a múltiples factores, pero es preciso subrayar uno en particular, que presentan Aguirre *et al.* (2001) como “la gran debilidad de la industria mezcalera, pues se basa en una materia prima demasiado barata, que enmascara la necesidad de mejorar la eficiencia del proceso de producción, normalización del producto y la modernización de su comercialización” (Aguirre *et al.*, 2001: 64). Así, se ha caído en el descuido y desinterés, por parte de los ejidatarios y propietarios de fomentar el manejo de las magueyeras silvestres, y por parte de los empresarios de mejorar los procesos de producción y comercialización, lo que ha contribuido a la desvalorización del recurso por el cual se paga un bajo precio (Aguirre *et al.*, 2001).

Con base en lo precedente puede decirse que el mezcal potosino “ha tenido numerosas épocas de auge y decadencia, pero nunca se han debido a escasez de materia prima sino a razones económicas y culturales” (Aguirre *et al.*, 2001: 84). La producción de mezcal en el altiplano potosino a partir de *A. salmiana* tiene ventajas con otros aguardientes de maguey debido al grado de humanización de la especie y a su capacidad de persistir de manera silvestre (Mora *et al.*, 2011).

El entendimiento del estado actual del proceso de elaboración de mezcal potosino, en particular de la etapa de fermentación, justifica su estudio, pues contribuirá en la mejora de la eficiencia en términos de rendimiento alcohólico y calidad del destilado. De esta

manera el sector productivo del maguey puede llegar a ser competitivo junto con el surgimiento de nuevos productos derivados del mismo (jarabes fructosados, fructanos y etanol) y de alto valor añadido (Aguirre *et al.*, 2001); y aún más por el valor que pueda dársele al entrar en sistemas de comercio justo o de producción orgánica, al tratarse de una especie que crece de manera silvestre. Por otro lado, en los últimos años la demanda creciente tanto nacional como internacional de los aguardientes de maguey (Varela, 2012) es una oportunidad de desarrollo para las poblaciones rurales (Aguirre *et al.*, 2001). La revalorización del recurso por el sector campesino debe entenderse en el contexto de las múltiples formas de aprovechamiento, y la creación y mejora de procesos, para que pueda repercutir en los precios de la materia prima, más atractivos para los ejidatarios y productores (Aguirre *et al.*, 2001).

Actualmente el proceso de elaboración de mezcal potosino sigue siendo tradicional como se hacía en las haciendas existentes hasta mediados del siglo pasado; este proceso al igual que el de otras regiones y al de otros aguardientes de maguey (tequila y bacanora), consta de cinco etapas; selección de la materia prima, cocción, molienda, fermentación y destilación (Pérez, 1997; Aguirre *et al.*, 2001), difiriendo únicamente la especie de maguey utilizada y el grado tecnológico implementado en cada una de las etapas mencionadas. La fermentación alcohólica es considerada una etapa crítica en la elaboración de bebidas alcohólicas, pues de ella depende el rendimiento alcohólico y la riqueza de compuestos de aroma y sabor en el destilado; en general, las fermentaciones tradicionales suelen tener bajos rendimiento y calidad variable en del producto, debido a la falta de control y estandarización de las etapas del proceso.

Hasta el momento se carece de información en detalle sobre el estado actual del proceso de elaboración de mezcal potosino, particularmente de la fermentación. Datos presentados por Núñez y Arellano (2000) revelan una eficiencia promedio de la fermentación en la fábrica de mezcal Laguna Seca del 60 %; en el 2001 Aguirre *et al.* encontraron una ineficiencia del proceso global estimada indirectamente del 100 % en la misma fábrica, resultante de la suma de ineficiencias en cada una de las etapas del proceso, por la falta de estandarización y control en las mismas. Por lo que, en primera

instancia, el entendimiento de cómo ocurren el proceso de la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal, puede dar lugar a establecer ciertos parámetros para su estandarización, que al vincularse con la mejora de cada una de las etapas del proceso se puede disminuir la variabilidad de los rendimientos y calidad del destilado, y de la misma manera se contribuya en el buen manejo y aprovechamiento de las magueyeras silvestres. Aguirre *et al.* (2001) han reconocido tres épocas o estaciones funcionales en el altiplano potosino (época más húmeda y cálida, época fría y época seca). Estas épocas o estaciones influyen marcadamente sobre la humedad y la temperatura del ambiente, y directamente en la succulencia y riqueza de reservas del maguey, y por lo tanto, en las características de los jugos extraídos y en el rendimiento de mezcal; y a su vez también afectan la temperatura de la cámara de fermentación, la cual es crítica para el crecimiento y reproducción de la población microbiana, y el desarrollo eficiente de la fermentación alcohólica.

Para su estudio, se utilizó la caracterización como técnica para la obtención de información en detalle del proceso; se establecieron muestreos en tres épocas del año con tres repeticiones, aunque al final solo se hayan obtenido los muestreos de las épocas fría y lluviosa, pues un cambio coyuntural en las operaciones en la fábrica durante la época seca, llevó a suspender los dos muestreos faltantes de dicha época, pues dejarían de ser comparables con los muestreos de las otras épocas, al modificarse la manera de operar el proceso.

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue:

- Caracterizar en detalle el estado actual de la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal en la fábrica de mezcal “Laguna Seca”, Charcas, San Luis Potosí.

Con el registro de datos y la cuantificación de las variables evaluadas en las muestras de la fermentación, se pudo explicar y entender las diferencias entre lotes de una misma época y entre épocas, así también el efecto que tienen ciertos factores en la fermentación, de esta manera se integraron el mayor número de elementos posibles que intervienen en la fermentación alcohólica, su rendimiento y calidad del destilado. Los análisis y cuantificaciones de las muestras de la caracterización se realizaron en los laboratorios del

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD), de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

1.1 Bibliografía

- Aguirre R., J. R.; H. Charcas S.; J. L. Flores F. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, SLP. México. 78 p.
- Aguirre R., J. R. 2009. Mezcal potosino un tesoro escondido. Nuestro mezcal. Por Amor al Arte. San Luis Potosí, SLP. México. 50:8-9.
- Bazant, J. 1980. Cinco haciendas mexicanas. Tres siglos de vida rural en San Luis Potosí. (1600-1910). El Colegio de México. México. 229 p.
- Carrillo, T. L. A. 2007. Los destilados de agave en México y su denominación de origen. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciencias. 87: 40-49.
- Cedeño C., M. 2003. Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. In: K. Jacques; T. P. Lyons; D. R. Kelsall (Eds.). The alcohol textbook. 4th ed. Nottingham University Press. England. pp. 223-245.
- Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology. 86: 11-22.
- Gschaedler M., A. 2007. La industria del mezcal en el altiplano potosino: tradiciones y retos tecnológicos. IPICYT. ciencia@sanluispotosi.mx. 30: 5.
- Mora L., J. L.; J. A. Reyes A.; J. L. Flores F.; C. B. Peña V.; J. R. Aguirre R. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. Agrociencia 45(4): 465-477.
- Núñez V., M. L.; M. Arellano P. 2000. Informe final de la asistencia técnica realizada a la empresa "Cia. Vinícola Alfa, S.A. de C.V." CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. México. 24 p.
- Payno, M. 1864. Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos. A. Boix. México. 132 p.
- Pérez Z., M. R. 1997. El mezcal en el altiplano potosino zacatecano. Bebidas Mexicanas. (febrero-marzo). 91-97.

Tello B., J. J.; E. García, M. 1985. The mezcal industry in the altiplano Potosino-Zacatecano of north-central México. *Desert Plants*. 7(2): 81-87.

Varela, R. 2012. Repunta consumo de mezcal. Aunque todavía muy lejos del desplazamiento que ha logrado el tequila, el consumo de mezcal creció en el último año. *El financiero*, (febrero 20) p. 20.

2. Antecedentes

El enfoque del presente trabajo es acorde con el área de adscripción del posgrado (Recursos Naturales Renovables), el más lógico, para la comprensión de las relaciones e implicaciones básicas que tiene la fisiología vegetal, la química, la biología, la física, la ingeniería y la biotecnología.

2.1 Generalidades de los magueyes

Las especies del género *Agave* conocidas comúnmente como magueyes, son un recurso natural renovable que se distribuye de manera natural desde el sur de Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela; estas especies junto con el resto de la familia Agavácea (Gentry, 1982; García, 1998; Eguiarte y Souza, 2007; Bellón *et al.*, 2009) se consideran endémicas de América. En México se encuentran cerca del 75 % de las especies de *Agave* (Figura 2.1) registradas (Gentry, 1982), en concordancia con el predominio en su territorio de condiciones ambientales propias de climas árido y semiárido. Esta riqueza de especies junto con la capacidad de los primeros grupos de cazadores recolectores de coexistir y sobrevivir en ambientes poco fértiles, condujo al aprovechamiento al máximo de los recursos disponibles como el maguey (Granados, 1993).

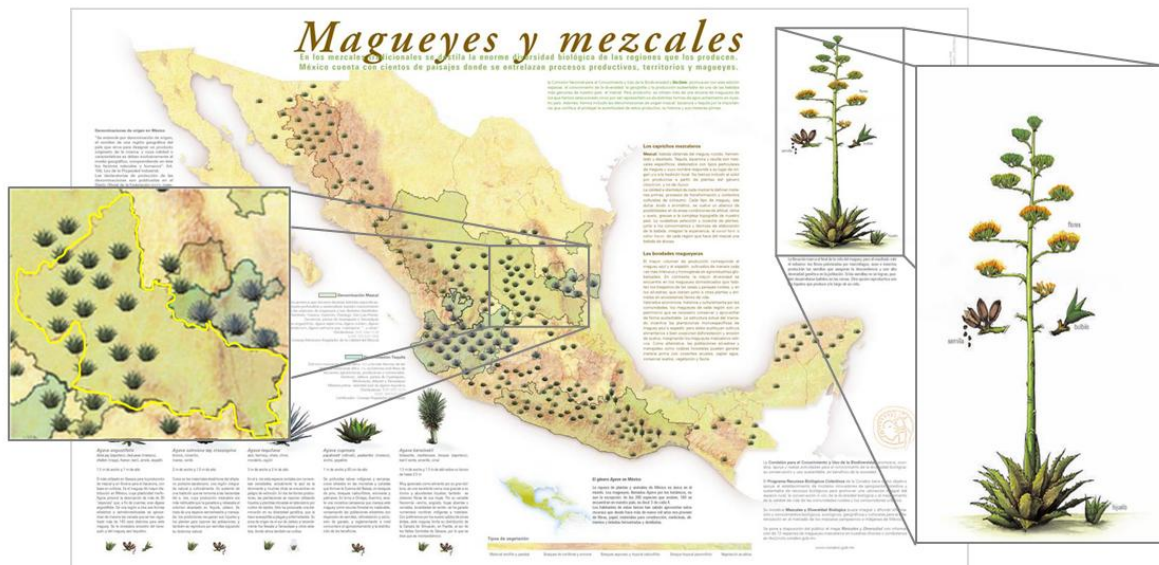


Fig. 2. 1 Distribución de especies de maguey en México y en San Luis Potosí (tomado de ©Conabio, 2005).

Así, gradualmente se descubrió, que del maguey se podían obtener diversos recursos, como alimento, fibras duras textiles, combustible, materiales para construcción, bebidas fermentadas y aplicaciones medicinales entre otras (Payno, 1864; Gentry, 1982; García, 1998). Esta polivalencia del maguey explica la gran importancia cultural, económica, ecológica y social que ha tenido en México (García, 2007); en efecto, México se considera no sólo centro origen, sino también de domesticación del maguey (Gentry, 1982; Mora *et al.*, 2011).

Los magueyes son plantas xerófitas, de hojas grandes dispuestas en rosetas, generadas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto o largo; las hojas por lo general son suculentas, fibrosas, y su forma, margen y tamaño varía de acuerdo con la especie. Dadas las condiciones de aridez en que se encuentran estas plantas han desarrollado un metabolismo fotosintético capaz de resistir estrés hídrico (Granados, 1993; García, 2007). En su mayoría son plantas monocárpicas, de inflorescencias realmente grandes, que florecen una sola vez en su vida y posteriormente mueren, aunque algunas especies primitivas son policárpicas. Esta inflorescencia surge una vez que la planta ha acumulado la mayor cantidad de reservas posibles en sus condiciones, las cuales entonces son invertidas en la reproducción sexual. El tiempo de madurez del maguey es variable, pues depende en gran parte de la especie y de las condiciones ambientales a las que se encuentre. La polinización en estas especies involucra fauna silvestre, principalmente murciélagos nectarívoros y en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (palomillas, abejas, abejorros, etc.) y aves (García, 2007). Sin embargo el poco éxito de la reproducción sexual en ambientes áridos y semiáridos, y el deterioro generado por la ganadería, causa que las semillas difícilmente encuentren las condiciones necesarias para su germinación y establecimiento (Aguirre *et al.*, 2001). La principal forma de reproducción de esta especie es la asexual, y se desarrolla mediante rizomas que emergen alrededor de una planta madre, una vez que inicia el periodo de lluvias. Otra forma de reproducción asexual es por bulbilos en las inflorescencias (evento que se presenta con poca frecuencia) (Granados, 1993; Aguirre *et al.*, 2001).

2.1.1 Metabolismo CAM

El maguey es una planta xerófita adaptada a vivir en regiones de clima árido y semiárido. La especialización de su metabolismo tiende a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos especializados (vacuolas); estos tejidos son responsables de la succulencia en hojas, como la adaptación más notable del maguey, ya que almacena agua durante la época de mayor precipitación y le permite sobrevivir durante el periodo seco (Granados, 1993; García, 2007).

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), por sus siglas en inglés (Crassulacean Acid Metabolism) se divide en fase nocturna y fase diurna; en la fase nocturna se lleva a cabo la fijación de carbono en ácidos orgánicos, principalmente malato, mientras que en la fase diurna los ácidos orgánicos (malato) acumulados son descarboxilados y se genera dióxido de carbono (CO_2), el cual se incorporara al ciclo de Calvin para la síntesis de carbohidratos (García, 2007).

Este tipo de plantas sólo durante la noche abre sus estomas, toman el CO_2 del aire, utilizado para la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la enzima PEP carboxilasa y se produce el oxalacetato, el cual, mediante las enzimas malato deshidrogenasa o aspartato transaminasa da lugar a la formación de malato o aspartato (moléculas de cuatro átomos de carbono), que se acumulan en las vacuolas de gran tamaño de las plantas CAM. La concentración del malato al final de la noche suele ser muy alta, lo que confiere a estas hojas cierta acidez al amanecer (Medrano y Flexas, 2008).

Durante el día los estomas se cierran, el malato se libera de la vacuola y es descarboxilado a piruvato por la PEP carboxiquinasa o malato deshidrogenasa; esta descarboxilación lleva consigo la liberación de CO_2 que entra al sitio activo de la rubisco en el ciclo de Calvin (Hopkins, 1999; Smith y Smith, 2001; Medrano y Flexas, 2008). El ciclo de Calvin se inicia con la incorporación del CO_2 al carbonilo de la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP): esta reacción es catalizada por actividad carboxilasa de la rubisco, produciendo dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PG). Cada molécula de 3PG es fosforilada por el adenosin trifosfato (ATP), reacción catalizada por la fosfoglicerato quinasa, y produce 1,3-bifosfoglicerato, el cual pierde un fosfato y se reduce a gliceraldehído-3-fosfato (G3P). Parte de este

compuesto se utiliza en la formación de hexosas y finalmente polisacáridos, otra fracción permite la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (Mathews y Van Holde, 1998).

El G3P puede isomerizarse a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), por medio de la triosa fosfato isomerasa. Una molécula de G3P y una de DHAP se combinan mediante la enzima fructosa bisfosfato aldolasa, para producir fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP), que al desfosforilarse da lugar a la fructosa 6 fosfato (F6P). La F6P se isomeriza a glucosa 6 fosfato (G6P) y finalmente a glucosa-1-fosfato (G1P), precursor de la formación de oligosacáridos y polisacáridos de la planta. La glucosa y fructosa son las hexosas más importantes como material energético en la planta, y su unión forma la sacarosa (Hopkins, 1999). La sacarosa es el producto fotosintético más utilizado para el transporte de carbohidratos a través de la planta y su síntesis la regula la sacarosa fosfato sintasa; la sacarosa también constituye un sustrato para la síntesis de fructanos (Mathews y Van Holde, 1998; Nobel, 1998).

El mecanismo de apertura de estomas sin pérdida de agua por la noche y de cierre durante el día, propio de las plantas tipo CAM, permite obtener ganancias netas de carbono con una elevada eficiencia en el uso de agua. Por otro lado las plantas perenes de regiones áridas y semiáridas destinan más productos resultantes de la fotosíntesis a raíces y a otros órganos de almacenamiento que a hojas, característica particular de la acumulación de reservas del maguey.

2.1.2 Compuestos del maguey

Los compuestos sintetizados por la planta del maguey se caracterizan por ser distintos a los de muchas otras especies vegetales, tanto los compuestos de reserva como los de defensa; estas peculiaridades pueden tener significado adaptativo, de estas especies a las condiciones de aridez.

2.1.2.1 Fructanos

Los fructanos son sustancias que sintetizan algunas especies de plantas y microorganismos, y se derivan de la sacarosa, a la que se unen sucesivas moléculas de fructosa por enlaces fructosil-fructosa del tipo β (2-1) o β (2-6) los cuales son resistentes a la acción de enzimas humanas; además, estas cadenas de fructosa se caracterizan por

tener una glucosa terminal (Vijn y Smeekens, 1999; Banguela y Hernández, 2006). Actualmente, se conocen seis tipos de fructanos: inulinas, levanos, graminanos, neoserias de inulina, neolevanos y agavinas (Vijn y Smeekens, 1999; Mancilla y López, 2006; Waleckx *et al.*, 2008). La estructura y el grado de polimerización de cada tipo depende del origen y la especie que lo sintetiza (Banguela y Hernández, 2006). En microorganismos, tienen la función de protección y energético temporal; en cambio, en las plantas su función es meramente energética. Los fructanos de origen vegetal llegan a desarrollar menor grado de polimerización y en ocasiones mayor complejidad estructural que los fructanos de origen microbiano (Banguela y Hernández, 2006).

Cerca del 15 % de especies de angiospermas almacenan fructanos como reserva energética, por lo que constituyen el segundo polisacárido de reserva más abundante después del almidón. Las familias con especies que almacenan algún tipo de fructano son: Liliaceae, Asteraceae, Poaceae, Agavaceae y Amaryllidaceae (Vijn y Smeekens, 1999; Banguela y Hernández, 2006).

Los fructanos de origen vegetal son solubles en agua y de carácter no reductor; su nueva y creciente aplicación en la industria alimentaria, tanto de productos convencionales como de funcionales es muy variada; así se les está utilizando como ingrediente espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de almidón y grasa, humectante y prebiótico (Madrigal y Sangronis, 2007). Su carácter funcional se refiere a efectos benéficos en padecimientos y problemas vinculados con el metabolismo energético del consumidor.

Por otro lado, estas moléculas han sido utilizadas desde antes de su descubrimiento en la elaboración de aguardientes de maguey, aunque durante milenios fueron consumidas como alimento y bebidas fermentadas. De tal manera que la materia prima para la elaboración de aguardientes, ha sido la piña o cabeza (tallo y bases de pencas) del maguey, órganos de almacenamiento de estos polisacáridos de reserva. Para elaborar aguardientes, los fructanos han sido aprovechados por medio de la hidrólisis térmica (cocción húmeda o seca) con temperaturas cercanas a 100° C, por tiempo determinado en hornos de mampostería o de piso, y más recientemente con la ayuda de autoclaves y enzimas. La finalidad de este proceso es primordialmente la conversión del polisacárido de

reserva, en glúcidos (fructosa y glucosa), utilizables por levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica, así también el reblandecimiento de las piñas o cabezas de maguey, lo que facilita la molienda y la extracción de los jugos.

2.1.2.2 Saponinas

Las saponinas son compuestos naturales que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal; por lo general se presentan en familias de la clase monocotiledónea, como Liliaceae, Agavaceae, Dioscoreaceae y Amaryllidaceae, pero también se les ha registrado en dicotiledóneas de las familias Solanaceae y Scrofulariaceae (Hernández *et al.*, 2005).

Su estructura está formada por una parte esteroidal hidrofóbica llamada sapogenina, y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. A esta unión de monosacáridos-sapogenina se le llama saponina, la cual produce espuma cuando se agita. Esta cualidad se relaciona con su propiedad detergente, pues la porción esteroidal es soluble en grasa y la parte azucarada en agua. En consecuencia, las saponinas pueden alterar las membranas citoplasmáticas, al contener ácidos grasos, causando efectos en la piel como picazón, y un efecto letal especialmente en microorganismos. La naturaleza de las saponinas le confiere propiedades farmacológicas, hemolíticas, antimicrobianas, insecticidas, molusquicidas y antitumorales, y se les usa en la elaboración de fármacos esteroidales (Nobel, 1998; Herrera *et al.*, 2007); de manera que al estar presentes en jugos de maguey cocido pueden actuar como inhibidores de la fermentación en la elaboración del mezcal, específicamente por el rompimiento de la pared celular de los microorganismos que realizan la fermentación alcohólica, esto suele suceder cuando hay una alta proporción de maguey inmaduro en la carga procesada.

2.1.3 Usos del maguey

Evidencias arqueológicas documentan que hace más que 10 000 años el maguey ya era consumido como alimento (agua y azúcares) en Mesoamérica, como la primer forma de aprovechamiento (Callen, 1967).

Seguramente, como supone Walton (1977) la primera relación trófica de los cazadores recolectores del altiplano mexicano con la planta del maguey, inició cuando por primera

vez consumen el escapo floral (quiotes) del maguey que tanto persuadía a fauna silvestre y sobresalía en la vegetación, y que al reconocerlo como alimento comenzaron a cortarlo y a consumirlo chupados por su jugo casi sin saponinas, hasta que descubrieron que después de un incendio natural resultaban más dulces, lo que Aguirre *et al.* (2001) suponen, que en ese momento pudo surgir la recolecta sistemática de las cabezas de maguey (tallo y bases de pencas), para ser cocidas y disponer de mayor cantidad de alimento almacenable sin restricciones estacionales. El siguiente paso adicional en la utilización del maguey fue extraer el jugo de las cabezas cocidas, macerándolas y exprimiéndolas, y al almacenar este jugo la fermentación sobrevino espontáneamente bajo condiciones naturales produciéndose así el vino de mezcal.

La importancia del maguey como fuente de recursos, radica en su disponibilidad y abundancia en regiones de clima árido y semiárido, y en el aprovechamiento integral de la planta desde hace miles de años. En efecto, además de alimento, se ha usado para la obtención de aguamiel, fibras duras para cordelería, forraje, medicinas, material para construcción, combustible, así también se ha usado como cerco vivo y planta de ornato, y en la producción de bebidas alcohólicas como el pulque y mezcal (Payno, 1864; Gentry, 1982) (Figura 2.2); su importancia ha sido tan significativa que fue deificada por los nahuas en la Diosa *Mayahuel*.

Recientemente, diversos estudios científicos encaminados a la diversificación de la planta del maguey, han demostrado el valor funcional de los polisacáridos de reserva de esta planta (fructanos) en el humano como prebiótico, así también el jarabe de fructosa, ambos destinados a la ingesta diaria de personas diabéticas, por el efecto favorable que tienen en su metabolismo energético (García, 2006; Rendón, 2009).

Así, no cabe duda porqué la planta del maguey fue reconocida como “el árbol de las maravillas”, pues su polivalencia ha sido muy amplia y apreciada desde hace muchos siglos en territorio mexicano. Por tanto, el maguey como recurso natural renovable, de gran importancia cultural, económica, ecológica y social de México (Eguiarte y Souza, 2007), merece ser estudiado dado que la producción actual, cultivado y silvestre, en su mayor

parte sólo es destinada a la producción de aguardientes como el tequila y el mezcal (Cházaro *et al.*, 2007).



Fig. 2. 2 Distintos usos del maguey.

2.1.4 *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick

El maguey mezcalero potosino (*A. salmiana*) (Figura 2.3), es un recurso natural renovable abundante en el altiplano potosino-zacatecano (Bazant, 1980), donde es un elemento importante de la vegetación natural junto a otras especies como el mezquite y el nopal. Este maguey se encuentra de manera silvestre, y su recolección y aprovechamiento actual se destina principalmente para la producción de mezcal (Carrillo, 2007), pero también es

subutilizado como forraje (Gómez *et al.*, 2009). En el estado, *A. salmiana* se encuentra desde 1000 a 2250 metros sobre el nivel del mar (msnm), en climas que van de semisecos (BS₁) a secos (BS₀), con precipitación de 320-720 mm anuales, y temperatura media anual puede ser de 16 a 22° C. El sustrato óptimo es de origen ígneo, somero o moderadamente profundo. Puede encontrarse en el matorral desértico micrófilo, matorral desértico crasicaule, y pastizales (Aguirre *et al.*, 2001).



Fig. 2. 3 Maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick).

2.2 Bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas surgieron con el acopio de frutos, raíces, semillas y otros materiales vegetales ricos en azúcares por los primeros cazadores recolectores; estos materiales al ser cocidos o al ser exprimidos y almacenar sus jugos azucarados, se fermentaron espontáneamente y se generaron así las bebidas alcohólicas con cualidades organolépticas y efectos distintos al jugo o solución original. Este proceso que suele ocurrir en forma espontánea es en la actualidad una tecnología de gran importancia en la industria alimentaria, farmacológica, energética, etc. Así, las bebidas alcohólicas históricamente han formado parte de costumbres y tradiciones sociales, religiosas y alimentarias, y por lo tanto han sido culturalmente de gran importancia para muchos pueblos del mundo (Aguirre, 2009). En México existen gran número de bebidas alcohólicas fermentadas de origen prehispánico como mezcal, tejuino, pulque, colonche, tepache, y pozol, y algunos destilados derivados de ellos como el mezcal, tequila, bacanora y sotol. El

consumo actual y potencial de bebidas alcohólicas en el mundo, explica que estas bebidas constituyan una fuente importante de divisas para el país que las produce.

2.2.1 Clasificación de las bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas se clasifican en fermentadas, destiladas y compuestas (Cuadro 2.1); las primeras son las más antiguas debido a que surgieron de manera espontánea sobre jugos azucarados, y se caracterizan por su bajo contenido alcohólico, 4 a 8° GL (4-8 %), pues el alcohol termina por ser tóxico para las propias levaduras que lo generaron (Aguirre, 2009).

Cuadro 2. 1 Clasificación de las bebidas alcohólicas (Aguirre, 2009).

Bebidas alcohólicas	Nombre	Procedencia
Fermentadas	Vino del Mediterráneo	Uva
	Cerveza	Granos germinados
	Tuba	Savia de cocotero
	Tepache	Piña
	Colonche	Tuna
	Pulque	Savia del maguey
Destiladas	Brandy, coñac, orujo, grapa, armañac y pisco	Destilados de vinos de uva
	Whiskies y vodka	Granos germinados
	Ron	Caña de azúcar
	Calvados	Manzana
	Kirsch	Cereza
	Mezcales, tequila, bacanora y raicilla	Magueyes cocidos
Compuestas	Tienen como base un aguardiente neutro, el cual se enriquece con aromas, sabores y colores aportados por follajes, flores, frutos, semillas, lácteos y azúcares diversos.	

Las bebidas destiladas surgieron con el afán de los alquimistas de concentrar el espíritu de las bebidas fermentadas responsables de la embriaguez; dichas bebidas se caracterizan por tener una concentración alcohólica mayor que 40° GL.

2.2.2 Mezcal

La palabra mezcal proviene del náhuatl, posiblemente de la palabra compuesta *mexcalli*; su primera parte, el prefijo (me) procedente de *metl*, es el nombre aplicado a todas las plantas del género *Agave*, conocidas como magueyes; y la segunda parte (*ixcalli*), se

refiere a su condición de cocido o hervido; es decir, mezcal probablemente significa maguey cocido (Aguirre, 2009). Seguramente en la época prehispánica, se le llamó así en un inicio al alimento producido del maguey, y por derivación dicho nombre se aplicó también al vino derivado de los jugos extraídos de las cabezas de maguey cocidas. Por otro lado, el aprovechamiento alimentario de la savia elaborada (aguamiel) del maguey, comenzó posteriormente a ser usada para la producción de pulque, a partir de la fermentación del aguamiel bajo condiciones naturales de humedad y temperatura, conformándose ambas como bebidas fermentadas, responsables de la embriaguez (Mora *et al.*, 2011).

Pero no fue sino hasta la introducción clandestina del alambique filipino por marineros de la Nao de China en el siglo XVI, que se inició la destilación del vino de mezcal (Aguirre *et al.*, 2001), obteniéndose los distintos aguardientes de maguey, entre lo que destaca actualmente el mezcal, el tequila y el bacanora, cuyas materias primas y procesos distintos les confieren propiedades organolépticas derivadas de la especie y su proceso de elaboración (García, 1998 y 2007; Vázquez *et al.*, 2007; Aguirre, 2009). Las principales especies utilizadas en la elaboración de mezcal son *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. marmorata* y *A. karwinskii* en Oaxaca; *A. cupreata* y *A. angustifolia* en Guerrero; *A. duranguensis* en Durango; y *A. salmiana* en Zacatecas y San Luis Potosí (Aguirre *et al.*, 2001).

Por lo tanto se entiende como mezcal, el aguardiente que se obtiene de la fermentación y destilación de jugos extraídos de las piñas o cabezas cocidas de ciertos magueyes silvestres y cultivados de los estados de Durango, Guerrero, Guanajuato, Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

2.2.3 Proceso de elaboración de mezcal en la fábrica Laguna Seca

El proceso de elaboración del mezcal potosino, al igual que en otras regiones y otros aguardientes de maguey (tequila y bacanora), consta de cinco etapas; selección de la materia prima, cocción, molienda, fermentación y destilación (Pérez, 1997), difiriendo únicamente la especie de maguey utilizada y el grado tecnológico aplicado en cada una de las etapas. Desde esta perspectiva y de acuerdo con el volumen de producción, la

elaboración de aguardientes de maguey, se puede clasificar en tres formas; artesanal, tradicional e industrial; en la producción artesanal (vinatas o palenques) propia de regiones como Oaxaca, Guerrero y Durango se utilizan técnicas y materiales muy rudimentarios en el proceso (Segura, 1891; Carrillo, 2007); la producción tradicional es similar a la que se hacía antiguamente en los grandes complejos agroindustriales de haciendas mezcaleras (Aguirre, 2009); y la producción industrial predomina en la producción de tequila, con mayor equipamiento y tecnología moderna en cada una de las etapas. De acuerdo con Pérez (1997), el proceso de elaboración de mezcal en el altiplano potosino sigue siendo tradicional y se realiza en cinco etapas (Figura 2.4).

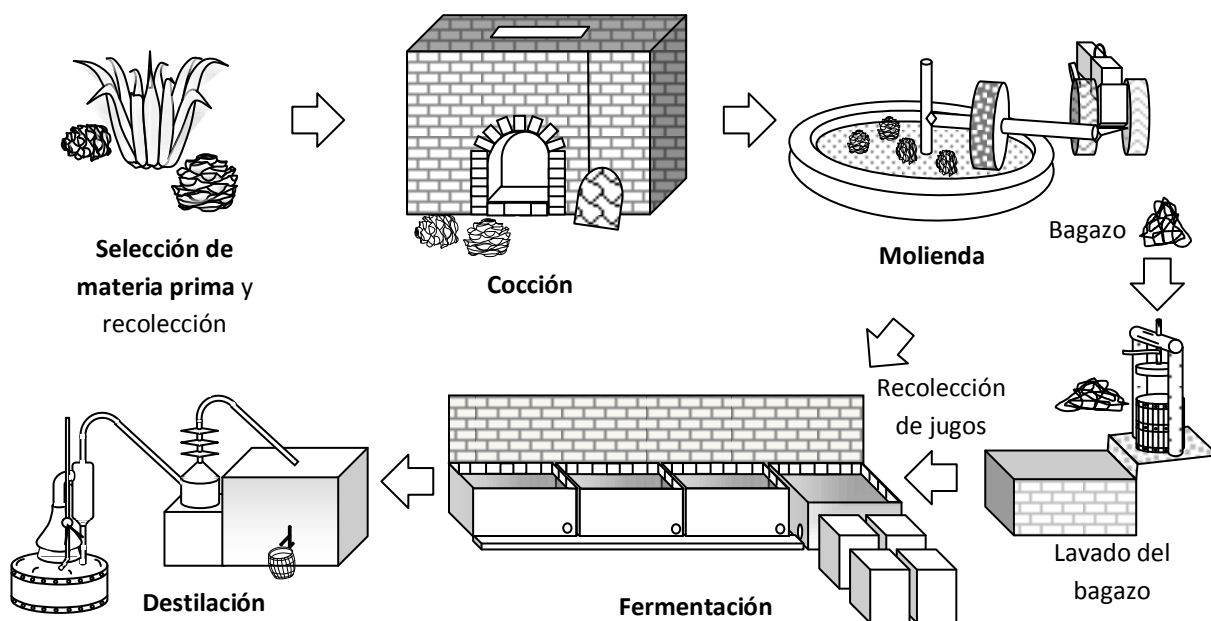


Fig. 2. 4 Proceso de elaboración de mezcal potosino.

2.2.3.1 Selección de la materia prima y recolección

Se inicia con la identificación de maguey maduro o quiotillo (maguey que florecerá en menos de un año, con aproximadamente 12 años de edad), por su mayor acumulación de compuestos de reserva (fructanos); el reconocimiento de este maguey lo hace el capitán de campo y su cuadrilla de trabajadores, con base en características del cogollo muy peculiares (adelgazamiento del cogollo). La madurez del maguey puede ser tan variable que se recolectan cabezas de maguey maduro desde unos 20 hasta cerca de 300 kg en el

mismo paraje (Aguirre *et al.*, 2001); sin embargo, por descuido y falta de control de quien realiza esta actividad, se llega a recolectar maguey tierno o inmaduro, que necesita más que dos años para alcanzar su madurez, aunque pueda tener unos 10 años de edad y sea tan grande como el maduro. Este maguey inmaduro es el menos deseable para la elaboración de mezcal, por su menor acumulación de compuestos de reserva y mayor contenido de saponinas. Como el tamaño no es el indicador de madurez, cabe resaltar la importancia del reconocimiento cabal de los estados de madurez del maguey, pues de ello dependerá la calidad de la materia prima y la composición del sustrato de la fermentación. Una vez identificadas, las plantas de maguey maduro se desviran, como se le denomina en la región al corte de las hojas (ricas en saponinas) del maguey, para obtener así una estructura conformada por el tallo y las bases de las pencas, la cual es llamada comúnmente cabeza o piña de maguey; finalmente las cabezas se tumban (Figura 2.5) para ser llevadas a la fábrica de mezcal (Aguirre *et al.*, 2001).



Fig. 2. 5 Selección, desvire y tumba de maguey mezcalero potosino.

2.2.3.2 Cocción

La cocción de las cabezas tiene como finalidad hidrolizar los fructanos en fructosa y glucosa (monosacáridos fermentables), generar compuestos organolépticos que le confieren aroma característico al mezcal, y el reblandecimiento de las piñas o cabezas de maguey, lo que facilita la molienda y la extracción de los jugos (Pérez, 1997). Las piñas enteras se cuecen en hornos elevados de mampostería (de unas 20 toneladas), con techos de bóveda, con una entrada al frente (Figura 2.6) (por donde se carga y descarga) y una

claraboya en la parte superior (por donde se termina la carga). El piso del horno está cubierto con una tarima de tablones y bajo esta, se reciben los efluvios y se canalizan al exterior a través de un caño. Los hornos son calentados por la parte inferior de la tarima con vapor proveniente de una caldera (2 kg/cm²), durante 27 a 36 h, alcanzando una temperatura entre 110 y 119 °C (Zamora *et al.*, 2010). Durante las primeras 16 h se generan cerca de 2000 L de efluvios, amargos y ricos en saponinas, los cuales son desechados. Después de este tiempo (17-36 h) se produce otro volumen similar, que en algunas épocas del año es recuperado, condensado parcialmente y adicionado al jugo para fermentar. En época de lluvias el total de efluvios se desechan. La cocción de las piñas enteras y el tiempo de cocción en las mezcaleras contrasta con lo que actualmente se hace en la industria tequilera, donde las piñas se seccionan o desgarran y se cuecen en autoclaves. En los procesos artesanales de Oaxaca y Guerrero, la cocción se realiza en hornos cónicos de pozo, calentados con leña, donde se pierde gran cantidad de azúcares fermentables por caramelización y carbonización (Granados, 1993; Anónimo, 1997, Carrillo, 2007).



Fig. 2. 6 Llenado de hornos de mampostería en la región del altiplano potosino.

2.2.3.3 Molienda o extracción de jugos

La extracción del jugo de las cabezas cocidas se realiza con un molino de piedra amonedada, la cual se hace girar sobre una pileta con piso de sillar ligeramente inclinado y con pequeños canales para facilitar el movimiento de los jugos por gravedad. Primeramente las cabezas cocidas son troceadas con hachas y después prensadas al paso

de la rueda de piedra accionada por una flecha concéntrica a la misma, tirada por un tractor (Figura 2.7).



Fig. 2. 7 Extracción del jugo de las cabezas de maguey cocido.

El subproducto generado (bagazo) se enjuaga en una pila de lavado y finalmente se exprime en una prensa de tornillo para extraer los jugos que quedaron entre las fibras. La extracción de jugos a golpes de mazo, que en ocasiones se realiza en Oaxaca y Guerrero, resulta un trabajo muy pesado y poco eficiente (Carrillo, 2007). El color del bagazo lavado y exprimido sugiere que probablemente aún contenga azúcares fermentables en cantidad considerable.

2.2.3.4 Fermentación de jugos

La fermentación de los azúcares se realiza a través del metabolismo de microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema semianaerobio (Vine *et al.*, 1997; Walker, 1998). Este proceso se realiza en pilas de mampostería con capacidad de 8000 a 12000 L, y es inducida por un caldo de fermento enriquecido con nitrógeno, y el calentamiento (30 a 35 °C) con un serpentín con vapor. La variación del tiempo de fermentación (27 a 39 h) depende en gran medida de la temperatura del microclima de la cámara de fermentación (Figura 2.8) y de la composición de los jugos de maguey, pues con presencia significativa de maguey tierno (con alto contenido de saponinas y menor de azúcares) en las cargas bajo proceso, se reconoce cierto olor pronunciado a “guishe” en las pilas de fermentación y un bajo rendimiento de mezcal (Aguirre *et al.*, 2001). El alto contenido en saponinas en el jugo de maguey inhibe la fermentación, probablemente por la propiedad histolítica de

las saponinas, y genera un bajo rendimiento de mezcal (Zamora *et al.*, 2010). El único indicador observado del término de la fermentación, es la caída de la capa superficial de espuma (Pérez, 1997). Probablemente las escasas condiciones de higiene favorecen el desarrollo de fermentos nativos o propios del maguey y del ambiente, los cuales son propagados y reciclados en el caldo de fermento preparado para cada fermentación; esta práctica influye probablemente en la selección y predominio de algunas levaduras nativas, como la población predominante y al mismo tiempo responsable de otras subordinadas, que influyen en las características organolépticas del mezcal.



Fig. 2. 8 Cámara y pila de fermentación.

En la industria tequilera el proceso de fermentación se lleva a cabo en tanques elevados de acero inoxidable, bajo condiciones parcialmente controladas que permiten homogenizar la calidad del producto (Cedeño, 2003). En el proceso artesanal de Oaxaca y otras regiones, así como en el tradicional de algunas de las mezcaleras de San Luis Potosí, las condiciones tan variadas de fermentación como pilas al aire libre, utilización de jugos con todo y bagazo y la carencia de control en cada etapa (Carrillo, 2007), permiten la proliferación de microorganismos no especializados en azúcares y el posible incremento de compuestos tóxicos o indeseables, como el metanol y propiedades organolépticas fúngicas indicadoras de mala calidad. El vino generado en la fermentación es canalizado a la siguiente etapa.

2.2.3.5 Destilación

La destilación se realiza por etapas en un alambique de cobre (Figura 2.9); el aumento de temperatura se controla con la presión de vapor del serpentín interior. En la primera etapa se separan las “cabezas” compuestas principalmente por metanol (55 a 80° GL). Posteriormente sale el “corazón” o mezcal, compuesto principalmente por etanol (45° GL) y por último, salen las “colas” (< 25 ° GL) compuestas por propanol, butanol y agua (Pérez, 1997).



Fig. 2. 9 Equipo de destilación fraccionada (alambique de cobre, refinador y condensación).

2.3 Fermentación

La fermentación es un proceso natural cuyo reconocimiento es muy antiguo, pues ocurre de manera espontánea en líquidos ricos en azúcares (Folch *et al.*, 2004). Su descubrimiento pronto formó parte de las tradiciones y costumbres de algunos pueblos del mundo, en la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas que hasta hoy persisten. En la actualidad es un proceso con grandes aplicaciones industriales, por lo que ya cuenta con bases científicas y tecnológicas sólidas, las cuales son objeto de muchas investigaciones.

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, típico de microorganismos (levaduras, bacterias y hongos) que al actuar sobre diversas fuentes de carbono, se encausa a la generación de compuestos orgánicos deseables (Mathews y Van Holde, 1998). Durante la fermentación, la energía obtenida proviene al igual que en la

respiración aerobia, de las reacciones de oxido-reducción durante el catabolismo de la fuente de carbono, pero en la fermentación las coenzimas reducidas no ceden sus electrones a una cadena cuyo aceptor final es el oxígeno, sino que los ceden directamente a un compuesto orgánico que puede ser reducido por distintas vías, hasta terminar en el producto característico de cada fermentación. Por lo tanto, la naturaleza del compuesto generado caracteriza los diferentes tipos de fermentaciones; así, se reconocen fermentaciones alcohólicas, lácticas, butíricas y acéticas entre otras (Prescott y Gordon, 1962).

Actualmente las fermentaciones tienen una creciente aplicación en la síntesis de compuestos orgánicos de interés para diversas industrias, como la alimentaria, agrícola, farmacéutica y recientemente en la bioenergética (Walker, 1998). Aunque estas aplicaciones industriales se basan en el uso de materia prima barata, indudablemente existen problemas tanto en la transformación como en el rendimiento y recuperación de productos metabólicos (Cruger y Crueger, 1993; Hernández, 2007), pues son procesos biológicos donde intervienen múltiples factores, y es difícil establecer las condiciones óptimas para los microorganismos deseables en cada proceso en particular (Fleet, 2003). Así, se tienen procesos tan complejos y meticulosos, como la producción industrial de etanol para combustible, en cambio, en la elaboración de bebidas alcohólicas (fermentadas y destiladas) el producto es apreciado por su riqueza de compuestos congéneres, los cuales dependen de procesos y materia prima menos depurados. Particularmente en la producción de aguardientes de maguey, las condiciones y la forma de realizar la fermentación alcohólica varían de acuerdo a la región, la especie de maguey utilizada, el nivel tecnológico implementado en las etapas del proceso y la percepción del productor (pequeño o industrial) sobre el producto (Pérez, 2007), factores que imprimen características organolépticas muy particulares a los destilados.

2.4 Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular eucarionte del phylum Ascomycota, el cual se reproduce de manera asexual por gemación, y sexual mediante la formación de ascas con ascosporas; tiene forma redonda u ovalada y el

tamaño varía según su etapa de crecimiento, de 2 a 10 μm (Prescott y Gordon, 1962; Leveau y Bouix, 2000). Es una especie especializada en el metabolismo de azúcares y se caracteriza por ser un microorganismo anaerobio facultativo, esto es, que en presencia de oxígeno respira para la producción de biomasa, y en ausencia fermenta produciendo alcohol y CO_2 (Figura 2.10), lo cual se conoce como efecto Pasteur (Russell, 2003).

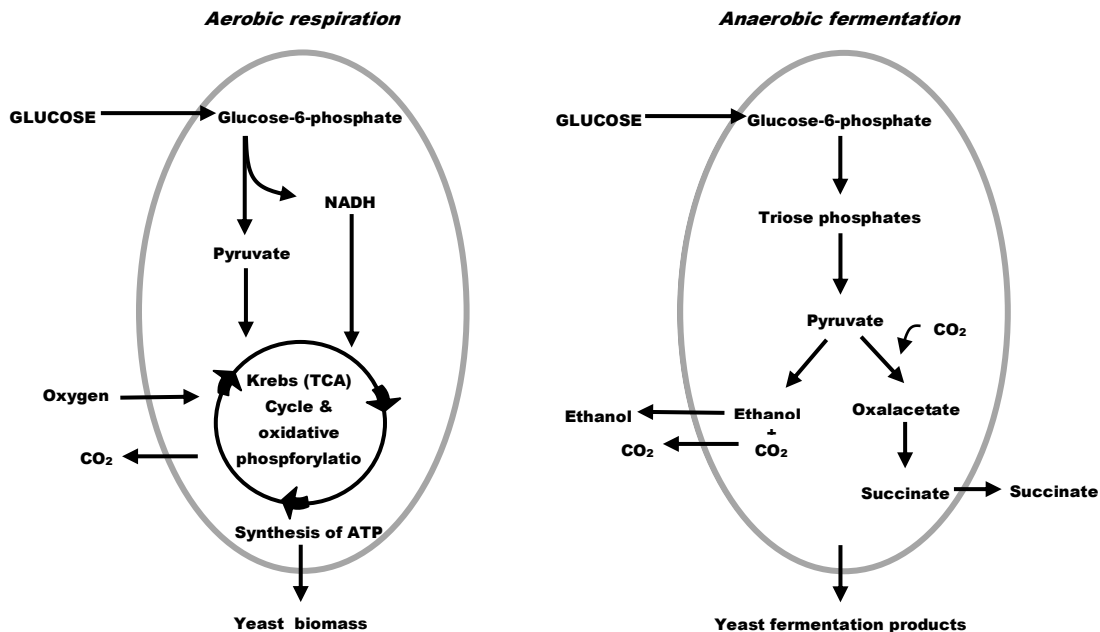


Fig. 2. 10 Metabolismo energético ambivalente de la especie *S. cerevisiae* (Walker, 1998).

La cantidad y origen del fermento, las características del sustrato y microambiente de la fermentación alcohólica en la producción de los aguardientes de maguey, influyen marcadamente sobre el tiempo de fermentación, el rendimiento y la calidad del destilado (Cedeño, 2003).

Al igual que otras levaduras, la *S. cerevisiae* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y mayormente en materiales vegetales que contienen azúcares (Prescott y Gordon, 1962). Sin duda las variantes silvestres de esta especie fueron las responsables de las primeras fermentaciones espontáneas y las más utilizada durante miles de años para la fabricación de alimentos y bebidas fermentadas, mucho antes de que se les identificara

como microorganismos y se descubriera como responsables de la fermentación (Phaff, 1981).

2.4.1 Factores de crecimiento

El ciclo de vida corto de la levadura es apropiado para un crecimiento y reproducción en sustratos líquidos, donde se facilita el transporte físico de nutrientes y el movimiento de solutos a la célula donde se llevan a cabo las reacciones enzimáticas en nivel intracelular (Walker, 1998). Las interacciones de una población de levaduras con su entorno a través del tiempo, son un factor importante en su desempeño pero también en su evolución, ya que determinan el umbral de subsistencia e inducen mecanismos de adaptación (Folch *et al.*, 2004). Este umbral está compuesto por elementos físicos, químicos y biológicos que conforman las condiciones ambientales para el crecimiento y reproducción de la población microbiana, y también el desarrollo de una fermentación eficiente.

2.4.1.1 Fuente de carbono

Existen diversas fuentes de carbono que las levaduras pueden utilizar para obtener energía; sin embargo la especie *S. cerevisiae* presenta mayor afinidad por moléculas de bajo peso molecular (monosacáridos), como la glucosa, fructosa, manosa y galactosa (Russell, 2003), propias de los materiales vegetales usados para la elaboración de bebidas fermentadas. El transporte de monosacáridos hacia el interior de la célula es por difusión facilitada (Leveau y Bouix, 2000), donde los solutos son traspuestos por un gradiente de concentración en la membrana, mediado por enzimas (permeasas) las cuales actúan como transportadores con estereoespecificidad por solutos; este transporte continúa hasta que la concentración intracelular es igual a la concentración extracelular (Walker, 1998). Una vez dentro de la célula los sacáridos se incorporan directamente a la ruta de la glucólisis donde son transformados en energía y productos metabólicos.

2.4.1.2 Fuente de nitrógeno

El nitrógeno es el segundo nutriente más importante después del carbono para el crecimiento de la levadura, pues este elemento es esencial para la síntesis de proteínas, aminoácidos, enzimas, nucleótidos y algunas vitaminas (Walker, 1998). Cuando existe

insuficiencia de este elemento en algunos jugos o soluciones azucaradas, se recurre al suministro externo de nitrógeno. Existen numerosas fuentes de nitrógeno de origen orgánico (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y aminas) usadas en nivel industrial, las cuales comúnmente son compuestos derivados de la hidrólisis de la proteína de soya; las fuentes de nitrógeno inorgánico más utilizadas son las sales de amonio (NH_4^+), las cuales aportan a la vez fosfatos, cloruros o sulfatos, compuestos que pueden favorecer la fermentación cuando existe deficiencia de alguno de estos elementos. Las fuentes de nitrógeno inorgánico son de menor costo y más usadas en procesos de menor nivel tecnológico; ambas fuentes de nitrógeno se clasifican según la velocidad de asimilación por la célula (Walker, 1998). La cantidad y el tipo de fuente de nitrógeno a usar en las fermentaciones depende de la especie de levadura, la insuficiencia de nitrógeno en los jugos o soluciones azucaradas y su costo relativo.

2.4.1.3 Oxígeno

El oxígeno disuelto en el medio es muy importante para el crecimiento y multiplicación de la levadura, pues el metabolismo aerobio de las hexosas, genera el sustrato (ATP) sobre el cual las enzimas de la vía respiratoria actúan durante el crecimiento, además de ser necesario para el mantenimiento de ciertas hidroxilaciones, como las relacionadas con la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos (Walker, 1998). El metabolismo aerobio de las levaduras es favorecido para su propagación, en el proceso de formación del caldo de fermento añadido al inicio de la fermentación.

2.4.1.4 Macro y micronutrientes

La levadura necesita de iones inorgánicos para su crecimiento, reproducción y funcionamiento, ya que ellos intervienen en muchas reacciones enzimáticas y metabólicas. Estos elementos se clasifican en macronutrientes y micronutrientes, en función de las necesidades de la levadura. La concentración requerida de macronutrientes es del orden milimolar, entre los cuales se tiene aniones no metálicos como el azufre (S) necesario para la biosíntesis de aminoácidos, y el fósforo (P) involucrado en la regulación del metabolismo celular y en la biosíntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos (Leveau y Bouix, 2000). En cambio cationes como el potasio (K) y magnesio (Mg), son necesarios

para establecer el ambiente catiónico metálico dentro de la célula, al regular muchas reacciones enzimáticas de la levadura. Otros minerales generalmente son requeridos en concentraciones micro y nano molar, son considerados micronutrientes u oligoelementos, como son el manganeso (Mn), hierro (Fe), calcio (Ca), zinc (Zn) y cobre (Cu), necesarios como cofactores enzimáticos en la biosíntesis de moléculas orgánicas (Walker, 1998).

2.4.1.5 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos necesarios en concentraciones muy bajas por la levadura, los cuales se caracterizan también por actuar como factores de crecimiento, y tener función catalítica o estructural en la levadura, ya que regulan numerosos procesos metabólicos no energéticos (Russell, 2003).

2.4.2 Metabolismo energético de la levadura

La obtención de energía metabólica para la biosíntesis de todo organismo se basa en la oxidación de compuestos orgánicos ricos en carbono, a través de procesos catabólicos como la respiración y fermentación (Mathews y Van Holde, 1998; Walker, 1998; Leveau y Bouix, 2000). Los dos principales portadores de energía en las células vivas son; el adenosin trifosfato (ATP) y el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+). El ATP es un portador de energía química en forma de bonos de fosfato de alta energía. El NAD es un portador de hidrógeno y electrones, y está involucrado en muchas reacciones de óxido reducción en la célula (Russell, 2003). Los microorganismos anaerobios y anaerobios facultativos como la levadura, utilizan los monosacáridos fermentables (hexosas) con un doble propósito, como compuestos de energía y como fuentes de carbono (Leveau y Bouix, 2000). Las reacciones en cadena que se generan en condiciones anaerobias, conducen a la producción de compuestos metabólicos en el medio y al agotamiento de la fuente de carbono y nutrientes.

2.4.2.1 Glucólisis

La glucólisis es la ruta bioquímica (Embden Meyerhof-Parnas) universal en las células vivas para el metabolismo de carbohidratos, ya que a partir de ella se obtiene la energía necesaria para su funcionamiento (Mathews y Van Holde, 1998). Esta ruta consisten en

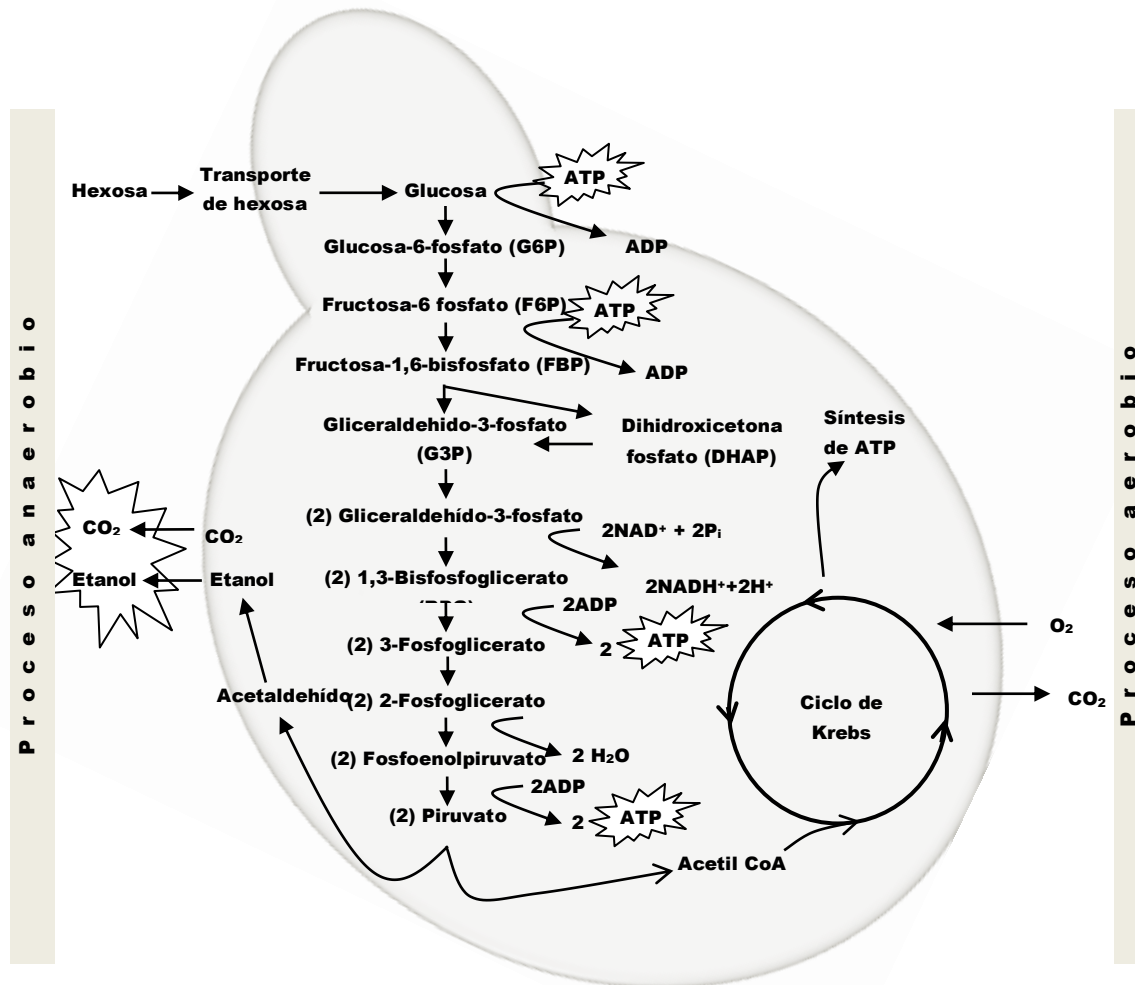


Fig. 2. 12 Metabolismo aerobio y anaerobio de *S. cerevisiae* (Walker, 1998).

2.4.3 Influencia del microambiente

El ciclo biológico de la levadura es muy corto; por ello es posible que en un mismo proceso o en una misma serie de procesos vinculados se puedan transmitir y acumular las modificaciones genéticas que favorecen la adaptación y supervivencia como reacción a las condiciones ambientales predominantes, como temperatura, humedad, sustrato, interacciones microbianas y la generación de productos metabólicos propios y ajenos, que pueden mermar su eficiencia (Folch *et al.*, 2004). Esta rusticidad de la levadura y su capacidad de reaccionar evolutivamente a condiciones cambiantes del medio, le permite generalmente dominar a otras poblaciones de microorganismos hasta el final de la fermentación alcohólica.

2.4.3.1 Temperatura

La temperatura de crecimiento y fermentación depende directamente de la especie y del antecedente térmico al que se enfrentó, sin embargo las levaduras tienen un amplio rango de temperatura ya que pueden crecer desde 5 a 35° C, aunque la temperatura óptima típica es de 25 a 30 ° C (Russell, 2003). La temperatura de crecimiento influye en la reproducción de la levadura y en la composición de ácidos grasos de las membranas plasmáticas, cuanto más baja es la temperatura de crecimiento más aumenta la producción de ácidos grasos insaturados (Leveau y Bouix, 2000); esto puede mejorar la permeabilidad de la membrana plasmática y tolerancia al etanol.

2.4.3.2 pH

Las levaduras se desarrollan aparentemente bien en pH ácidos; aunque normalmente el pH óptimo dependerá de cada cepa, en general varía de 4.5 a 6.5 (Walker, 1998).

2.4.3.3 Factores de estrés

La reacción al estrés es natural en los seres vivos, y contribuye a su supervivencia. Sin duda las levaduras se enfrentan a una serie de situaciones tanto favorables como desfavorables; así al inicio de la fermentación les resultan críticos factores como la temperatura, pH, sustrato, nitrógeno, anaerobiosis, etc., y conforme transcurre y hasta que la fermentación termina, toman importancia los compuestos metabólicos propios y ajenos liberados en el medio, como el etanol, CO₂, ácidos orgánicos, enzimas, toxinas, etc. La interacción de la levadura con su entorno a través del tiempo, promueve su evolución y gradualmente puede inducirle mecanismos de adaptación y supervivencia que favorecen su tolerancia a ciertos factores de estrés propios de los procesos donde se le utiliza. La levadura *S. cerevisiae* es una especie increíblemente resistente a diversas condiciones de estrés aunque con menoscabo de su eficiencia, por lo que es importante reconocer y favorecer sus condiciones óptimas (Russell, 2003).

Los tipos principales de estrés para la levadura *S. cerevisiae*, son térmico, osmótico y oxidativo (Folch *et al.*, 2004). El estrés térmico reduce el crecimiento y la eficiencia de fermentación; temperaturas subóptimas favorecen la producción de ácidos grasos que

ayudan a la protección de la membrana celular. En cambio con temperaturas superiores a la óptima se induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (siglas en inglés por heat shock proteins), las cuales dificultan la separación de agregados de proteína desnaturalizadas por altas temperaturas (Russell, 2003; Folch *et al.*, 2004). El estrés osmótico puede ser causado por altas concentraciones en el medio de sustrato, etanol, CO₂, ácidos orgánicos y otros productos metabólicos propios y ajenos, los cuales pueden afectar significativamente la vitalidad y viabilidad de la levadura. El estrés osmótico es regulado por la síntesis y acumulación de glicerol, principal mecanismo de control de la turgencia y el equilibrio redox de la célula. El glicerol también protege a la célula contra altas temperaturas, el estrés oxidativo y del estrés osmótico. Esta capacidad de adaptación a condiciones ambientales desfavorables tiene sus límites y cuando se exceden, el daño puede llegar a ser letal para la levadura (Russell, 2003).

2.4.3.4 Inhibidores de la fermentación

Estos inhibidores son compuestos que actúan en nivel intracelular y extracelular, al ser responsables del estrés osmótico y de la interacción del medio con la pared celular de la levadura. Estos pueden formar parte de la materia prima, como es el caso de las saponinas del maguey con propiedades líticas letales para la levadura, y por tanto afectan considerablemente la fermentación. Otros compuestos inhibidores, como el etanol, CO₂, enzimas, ácidos grasos, etc. son originados durante la fermentación, por la misma *S. cerevisiae* y otros microorganismos no especializados en azúcares, los cuales en ciertas concentraciones pueden ser letales para la levadura responsable de la fermentación alcohólica.

2.3.3.4.1 *Etanol*. Es el principal producto metabólico de la levadura (*S. cerevisiae*) en condiciones anaerobias; pueden alcanzarse concentraciones extracelulares de hasta 12 %, las cuales resultan tóxicas para la misma levadura, pues el etanol afecta la permeabilidad de la membrana citoplasmática y disminuye su selectividad (Barre *et al.*, 2000).

2.3.3.4.2 *Dióxido de carbono (CO₂)*. El CO₂ representa el segundo producto metabólico de la levadura en condiciones anaerobias y tienen un efecto tóxico en altas

concentraciones, ya que inhibe principalmente el crecimiento de la levadura, y particularmente la formación de ascas y ascosporas; también afecta la absorción de algunos aminoácidos (Prescott y Gordon, 1962; Russell, 2003).

2.3.3.4.3 *Saponinas*. Las saponinas son compuestos formados por una parte esteroidal hidrofóbica llamada sapogenina y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. La parte esteroidal es soluble en grasa y la parte azucarada en agua; estas cualidades permiten que al estar presentes en el medio de fermentación, sean solubles en el medio y al mismo tiempo en los ácidos grasos de la pared celular de la levadura, provocando su muerte.

2.4.4 Productos metabólicos de la fermentación alcohólica

El producto final de la fermentación alcohólica se le conoce como vino o cerveza, pues estas son las bebidas alcohólicas fermentadas más conocidas. El vino es el común dominador de las bebidas alcohólicas destiladas y compuestas, pues todas estas parten de una fermentación alcohólica y un método para estabilizar el producto final. La decantación, filtración y clarificación son procesos usados para estabilizar las bebidas fermentadas, y la destilación para generar los aguardientes, los cuales suelen tener cuatro o cinco veces la concentración alcohólica de los vinos. La importancia de la estabilización de los vinos radica en evitar su descomposición y pérdida de características organolépticas durante el almacenamiento.

Las características organolépticas de las bebidas alcohólicas resultan en buena parte de la actividad microbiana (bacterias, levaduras y hongos) responsable de la producción y acumulación de compuestos metabólicos deseables e indeseables en el medio durante la fermentación alcohólica (Fleet, 2003). Cabe enfatizar que las especies del género *Saccharomyces* pueden ser las dominantes durante toda la fermentación alcohólica (Fleet, 1984), pero en condiciones inapropiadas para estas especies pueden favorecer la proliferación y dominio de microorganismos indeseables durante el proceso. Además de etanol, el principal producto metabólico, generan compuestos organolépticos minoritarios, los cuales pueden ser clasificados en otros alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas, compuestos azufrados y ácidos orgánicos (Leveau y Bouix, 2000).

2.4.4.1 Producción de alcoholes superiores

Desde el punto de vista cuantitativo los alcoholes superiores son los compuestos más abundantes después del etanol y se derivan del metabolismo (catabolismo y anabolismo) de aminoácidos (Leveau y Bouix, 2000) (Cuadro 2.2). El catabolismo de aminoácidos se lleva a cabo por reacciones de desaminación y descarboxilación de las cuales se genera el aldehído que será convertido en alcohol superior por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa (Escalante *et al.*, 2006). Esta ruta ocurre cuando la disponibilidad de aminoácidos es alta y se le conoce como ruta de Ehrlich. La otra ruta es la anabólica, la cual ocurre cuando existe deficiencia de aminoácidos o de nitrógeno en general, lo cual disminuye la cantidad de grupos amino, por lo que los alfa-cetoácidos no se transaminan, si no que se descarboxilan originando aldehídos que después son convertidos en alcoholes superiores. Otro factor que influye en la producción de alcoholes superiores son las especies de levadura implicadas en la fermentación, pues algunas pueden producirlos en mayor o en menor cantidad (Díaz *et al.*, 2008). Se ha demostrado el aumento de la síntesis de alcoholes superiores con aumento de la temperatura de fermentación, así como con la oxigenación del sustrato en la fase de crecimiento y bajo ciertas condiciones (Arellano *et al.*, 2008).

Cuadro 2. 2 Aminoácidos para la producción de alcoholes superiores (Leveau y Bouix, 2000).

Aminoácido	→	α-ceto-ácido	→	Aldehído	→	Alcohol
Metionina	Amino deshidrogenasa	α-cetobutirato	Piruvato descarboxilasa	Propionaldehído	Alcohol deshidrogenasa	Propanol
Valina		α-cetoisovalerato		α-hidroxi-isovalaldehído		Isobutanol
Leucina		α-cetoisocaproato		Isocaraldehído		3 metil butanol
Isoleucina		α-ceto-β-metil-valérico		α-hidroxi-isocaprilaldehído		2 metil butanol
Fenilalanina		-		-		2 fenil etanol

2.4.4.2 Ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos depende probablemente de tres vías metabólicas de la levadura; estos ácidos tienen efecto sobre las características organolépticas del producto

y su pH (Barre *et al.*, 2000; Russell, 2003). Algunos ácidos orgánicos, como el acetato, succinato, α -cetoglutarato, malato y citrato, son derivados del piruvato por el funcionamiento limitado del ácido cítrico (Krebs) durante la etapa de crecimiento de la levadura. Otros ácidos, como el ácido isovalérico e isobutírico, son derivados de la síntesis de aminoácidos y alcoholes superiores. Y la última vía de producción ocurre durante la síntesis de ácidos grasos a partir de manoil-coenzima A. Algunos de estos últimos ácidos grasos son elementos constitutivos de las membranas de la levadura, como el ácido palmitoleico, esterárico, y oleico; y otros son ácidos de cadena corta como el caproico, caprílico y cáprico, aunque estos últimos también pueden ser producidos por oxidación de ácidos grasos de cadena más larga (Barre *et al.*, 2000).

2.4.4.3 Ésteres

Los ésteres representan el grupo más numeroso de compuestos metabólicos y con mayor impacto organoléptico producido en la fermentación alcohólica. Son producto de reacciones enzimáticas entre los derivados de acetil-CoA de ácidos grasos y los alcoholes libres. La síntesis de ésteres consiste en enzimas la acil-CoA sintetasa y la alcohol acetil-CoA transferasa (Russell, 2003). La formación de ésteres depende de la disponibilidad del compuesto acetil-CoA derivado de los ácidos grasos durante la fase de crecimiento, así como de la disponibilidad de alcohol y la velocidad de esterificación.

2.4.4.4 Aldehídos y cetonas

Los aldehídos se sintetizan en la vía de síntesis de los alcoholes por descarboxilación de los ácido α -cetónicos. La mayor parte son reducidos a alcoholes, una pequeña parte es oxidada a ácidos, pero durante la fermentación pueden excretarse aldehídos en exceso. Los aldehídos de cadena corta imprimen una nota fresca y afrutada al aguardiente, y los de cadena larga dan notas amargas. Los ácido α -cetónicos pueden contribuir a la formación de dicetonas y de hidroxicetona, por condensación con un aldehído y posterior descarboxilación (Leveau y Bouix, 2000).

2.4.4.5 Compuestos azufrados

Los compuestos azufrados no provienen directamente del metabolismo de la levadura, sino de combinaciones entre compuestos azufrados de las materias primas y compuestos del metabolismo (Leveau y Bouix, 2000).

2.5 Señalamientos conclusivos

Las especies del género agave son un elemento importante de la vegetación natural de las zonas áridas y semiáridas de México, por su riqueza en el país y las variadas formas de aprovechamiento que se les ha dado, se considera su centro de origen y domesticación.

La especialización del metabolismo de maguey le confiere características muy peculiares, que dieron origen a la diversificación de la planta, y dicha polivalencia explica la gran importancia cultural, económica, ecológica y social que ha tenido el maguey en México.

En México existen gran número de bebidas alcohólicas fermentadas de origen prehispánico, algunas de las cuales luego fueron la base para la obtención de las bebidas destiladas. Particularmente los aguardientes de maguey surgen con la introducción del alambique a México y actualmente se reconocen al mezcal, tequila y bacanora, entre otros, cuyas materias primas (especie de maguey) y procesos distintos les confieren propiedades organolépticas muy particulares.

En el altiplano potosino el maguey mezcalero (*A. salmiana*) es un recurso natural abundante. Por los antecedentes históricos de aprovechamiento y distribución natural de este maguey en la región, el estado cuenta con la denominación de origen para la producción de mezcal, lo cual es en la actualidad su principal forma de aprovechamiento.

La producción de mezcal ha sido por mucho tiempo de gran importancia económica para las poblaciones rurales de la región. Actualmente sólo existen unas pocas fábricas de mezcal que trabajan de manera continua y en un nivel mínimo de su capacidad instalada y de eficiencia posible. Esta problemática tal vez se deba, entre otras circunstancias, al bajo costo de la materia prima, que enmascara la necesidad de mejorar la eficiencia del proceso, y a los problemas de demanda y comercialización que limitan la producción y la inversión en equipo.

La fermentación alcohólica es un proceso complejo que surge de manera natural en los jugos azucarados extraídos de frutos y otros materiales vegetales. Su principio se basa en una fuente de carbono y la presencia de microorganismos, que se distribuyen preferentemente en el reino vegetal. Con el paso del tiempo el humano aprendió a mejorar y controlar el proceso de fermentación hasta desarrollarlo en nivel industrial con fines biotecnológicos muy particulares (en la obtención de alimentos, bebidas alcohólicas, biocombustibles, etc.).

Para entender el proceso de fermentación es importante conocer ¿cómo surge? y ¿en qué circunstancias se relaciona con el humano?, es decir, las condiciones que dieron origen a la fermentación espontánea, la naturaleza de la materia prima (propiedades físicas y químicas de la planta, material o fruto y su relación con su fenología), y las reacciones en cadena que conducen al agotamiento de la fuente de carbono (rutas bioquímicas específicas que desarrollan los microorganismos para la producción de compuestos metabólicos).

Particularmente la fermentación es la etapa más importante en la elaboración de bebidas alcohólicas, pues de ella depende en gran medida el rendimiento y la calidad del destilado. El estudio directo de este proceso en una fábrica de mezcal representativa de la región es un gran aliciente para obtener información relevante y determinante para la estandarización tanto del proceso como del producto. A la vez, el registro de las condiciones actuales de fermentación, permite establecer las bases para el diseño de fermentaciones experimentales en laboratorio, tendientes a corroborar sus limitaciones y a generar las mejoras para superarlas.

La revalorización y el aprovechamiento racional de las magueyeras silvestres, debe estar en función de la mejora de los procesos de transformación del recurso, de manera que revele su rentabilidad real y a la vez se constituya en elemento importante del desarrollo rural.

2.6 Bibliografía

- Aguirre R., J. R.; H. Charcas S.; J. L. Flores F. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, SLP. México. 78 p.
- Aguirre R., J. R. 2009. Mezcal potosino un tesoro escondido. Nuestro mezcal. Por Amor al Arte. San Luis Potosí. SLP. México. 50:8-9.
- Anónimo. 1997. Mezcal, elixir de larga vida. Gobierno del Estado de Oaxaca. Cámara Nacional de la Industria del Mezcal. BANCOMEXT y CVS. México. 120 p.
- Arellano M.; C. Pelayo.; J. Ramírez.; I. Rodríguez. 2008 Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 835-841.
- Banguela, A.; L. Hernández. 2006. Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biología Aplicada* 23(3): 202-210.
- Barre, P.; B. Boldin; S. Sequin; M. Feuillant; J. M. Sablayrolles; J. M. Salmon. 2000. La levadura de fermentación alcohólica. En: C. Flanzly (Ed.). *Fundamentos científicos y tecnológicos. Enología*. 2ª ed. Mundi Prensa, México. pp. 274-314.
- Bazant, J. 1980. Cinco haciendas mexicanas. Tres siglos de vida rural en San Luis Potosí. (1600-1910). El Colegio de México. México. 229 p.
- Bellon, M.R.; A. F. Barrientos P.; P. Colunga G.; H. Perales; J. A. Reyes A.; R. Rosales S.; D. Zizumbo V. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. En: *Capital natural de México. Estado de conservación y tendencias de cambio*. CONABIO. México. 2:355-382.
- Callen, E. O. 1967. Analysis of the Tehuacan coprolites. In: Byers, D. S. (Ed.). *The Prehistory of the Tehuacan Valley. Environment and Subsistence*. University of Texas Press. Austin, Texas. USA. pp. 261-289.
- Carrillo, T. L. A. 2007. Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Universidad Nacional Autónoma de México. Ciencias*. 87: 40-49.
- Cedeño C., M. 2003. Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. In: K. Jacques, T. P. Lyons and D. R. Kelsall (Eds.). *The alcohol textbook*. 4th ed. Nottingham University Press. England. pp. 223-245.

- Cházaro B., M. J.; O. Valencia P.; M. P. Hernández R. 2007. Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. En: J. A., Vázquez G.; M. J. Cházaro B.; G. Hernández V.; E. Flores B.; Y. L. Vargas R. (Eds.) Agaves del occidente de México. México. pp. 123-126.
- CONABIO. 2005. Mezcales y biodiversidad. 2ª ed. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. México (Mapa).
- Cruger, W.; A. Crueger. 1993. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 413 p.
- Díaz M., D. M.; D. Marie L.; M. Estarron E.; P. Strehaiano. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*. 42: 608-616.
- Eguiarte L., E.; V. Souza. 2007. Historia del agave y sus parientes: evolución y ecología. En: P. Colunga G. M.; A. Larqué S.; L. E. Eguiarte; D. Zizumbo V. (Eds.) En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. (Eds.). CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT, INE. Mérida, Yucatán. México. pp. 3-21.
- Escalante M., P.; L. González H.; A. P. Barba de la R.; A. de León R. 2006. El mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. *Bebidas Mexicanas*. 15: 10-18.
- Fleet G. H.; S. Lafon L.; P. Riéreau G. 1984. Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (5):1034-1038.
- Fleet G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 11-22.
- Folch M., J. L.; A. Garay A.; F., Lledías; A. A., Covarrubias R. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 46: (1-2): 24-46.
- García P., L. G. 2006. Evaluación del jarabe de maguey mezcalero (*Agave salmiana*) en ratas diabéticas. Tesis de Maestría. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, SLP. México. 85 p.
- García M. A. 1998. Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México, SIGSA. México. 114 p.
- García M. A. 2007. Los agaves de México. Universidad Nacional Autónoma de México. *Ciencia*. 87: 14-23.

- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press. Tucson, Arizona. USA. 670 p.
- Gómez G., A.; J. M. Pinos R.; J. R. Aguirre R. 2009. Manual de producción caprina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, SLP. México. 186p.
- Granados S., D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. 1ª Edición. México. 252 p.
- Hernández N., M.T. 2007. Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Boletín electrónico TEC Landívar. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. 8: 1-17.
- Hernández, S. R.; G. C. Lugo C.; L. Díaz J.; S. Villanueva. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. Revista Digital Científica y Tecnológica. e-Gnosis. 3: 1-9.
- Herrera, N.; E. Correa; D. Cardona; R. Archbold; F. Torres; W. Quiñone;s I. D. Velez. 2007. Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. Scientia Et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. 33(8):87-90.
- Hopkins, W. G. 1999. Introduction to plant physiology. 2a ed. Wiley. New York. USA. 512 p.
- Leveau J. Y.; M. Bouix.; tr. F. J. Carballo G. 2000. Microbiología industrial: Los organismos de interés industrial. Acribia. Zaragoza. España. 595 p.
- Madrigal L.; E. Sangronis. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57(4): 387-396.
- Mancilla M., N. A.; M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 7832-7839.
- Mathews, K. C.; K. E. Van Holde. 1998. Bioquímica. 2ª Edición McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España. 1283 p.
- Medrano, H.; Flexas, J. 2008. Fotorrespiración y mecanismos de concentración del dióxido de carbono. En: J. Azcon B.; M. Talon. (Eds.) Fisiología vegetal. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España. pp. 227-246.
- Mora L., J. L.; J. A. Reyes A.; J. L. Flores F.; C. B. Peña V.; J. R. Aguirre R. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. Agrociencia 45(4): 465-477.
- Nobel, P. S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. 1ª edición. Trillas. México. 211 p.
- Núñez V., M. L.; M. Arellano P. 2000. Informe final de la asistencia técnica realizada a la empresa "Cia. Vinícola Alfa, S.A. de C.V." CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. México. 24 p.

- Payno, M. 1864. Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos. A. Boix. México. 132 p.
- Pérez, C. 2007. Mezcales tradicionales de los pueblos de México, herencia, cultura y biodiversidad. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciencias. 87: 54-60.
- Pérez Z., M. R. 1997. El mezcal en el altiplano potosino zacatecano. Bebidas Mexicanas. (febrero-marzo). 91-97.
- Phaff H. J. 1981, Microorganismos industriales. Edición español. Scientific American. Investigación y Ciencia 62:23-37.
- Prescott S. C.; Gordon Dunn. C. 1962. Microbiología industrial 3a ed. Editorial Aguilar-Madrid. Madrid, España. 997 p.
- Rendón H. J. A. 2009. Fructanos de maguey efecto prebiótico y metabólico. Tesis de Maestría. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San. Luis. Potosí, SLP. México. 92 p.
- Russell. 2003. Understanding yeast fundamentals. In: K. A. Jacques K.; T. P. Lyons; D. R. Kelsall. The alcohol textbook.. 4th ed. Nottingham University Press. England. pp. 85-119.
- Segura, J. C. 1891. El maguey. Memoria sobre el cultivo y beneficio de sus productos. 3^a Ed. Oficina Tip. de la Secretaría de Fomento. México. 228 p.
- Smith, R. L. y T. M. Smith. 2001. Ecología. 4^a Ed. Addison Wesley. Madrid, España. 642 p.
- Tello B., J. J.; E. García M. 1985. The mezcal industry in the altiplano Potosino-Zacatecano of north-central México. Desert Plants. 81-87.
- Vázquez G., J. A.; M. J. Cházaro B.; G. Hernández V.; E. Flores B.; Y. L. Vargas-Rodríguez. 2007. Agaves del occidente de México. UDG, CRT, CIATEJ, LUS, CONAFOR. México. 221 p.
- Vijn I.; S. Smeeckens. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate. Plant Physiology. 120: 351-359.
- Vine, R. P.; E. M. Harkness; T. Browning; C. Wagner. 1997. Winemaking from grape growing to marketplace. Chapman & Hall. New York. USA. 439 p.
- Waleckx E.; A. Gschaedler; B. Colonna-Ceccaldi; P. Monsan. 2008. Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. Food Chemistry. 108: 40-48.
- Walker, M. G. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Wiley. Chichester, England. 350 p.
- Walton, M. K. 1977. The evolution and localization of mezcal and tequila in México. Geográficas. 85: 113-132.

Zamora P., C.; B. I. Juárez F.; J. R. Aguirre R.; D. Ortiz P.; C. I. Godínez H.; G. Álvarez F. 2010.
Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey
mezcalero potosino. e-Gnosis 8 (7): 1-11.

3 Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca”

3. Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca”

César Iván Godínez Hernández¹, Bertha Irene Juárez Flores², Juan Rogelio Aguirre Rivera²,
Rosa Elena Delgado Portales³, Cynthia Zamora Pedraza¹

¹Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales (PMPCA), Área de Recursos Naturales Renovables. Altair 200. Colonia Del Llano. C.P. 78377. San Luis Potosí, S.L.P.
navingod_@hotmail.com

²Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Altair 200. Colonia Del Llano. C.P. 78377. San Luis Potosí, S.L.P

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Manuel Nava No. 6 Zona Universitaria. C.P. 78210. San Luis Potosí, S.L.P

Resumen

El maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick) es un recurso natural renovable que crece de manera silvestre en el altiplano potosino, y éste se ha utilizado por mucho tiempo como materia prima para la elaboración de mezcal, siendo ésta, la actual y principal forma de aprovechamiento. La industria mezcalera ha sido de gran importancia económica para las poblaciones rurales de la región, pues el maguey es de los pocos recursos bióticos abundantes y disponibles; sin embargo, el bajo costo que se paga por el recurso, enmascara la necesidad de mejorar la eficiencia de sus formas de aprovechamiento (mezcal). El objetivo de este trabajo fue caracterizar el estado actual de la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal potosino, en una de las fábricas representativas del la región, de las pocas que trabajan de manera continua y en un nivel mínimo de su capacidad instalada. La caracterización se realizó a través de las variables; temperatura, pH, °Brix, AF (fructosa y glucosa), densidad celular, nitrógeno y etanol, en dependencia de la época del año. En general la fábrica de mezcal Laguna Seca actualmente trabaja a una quinta parte de su capacidad instalada. La fermentación alcohólica es inducida con un caldo de fermento nativo reciclado y propagado previamente; y se realiza sin el bagazo que se genera en la molienda. Las condiciones

durante la reactivación y la propagación del fermento, son inadecuadas de acuerdo a lo registrado como óptimo para tequila. Existen diferencias significativas atribuidas al efecto ambiental como la temperatura, el pH y los AF de los jugos frescos de la molienda. Se utiliza $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ (fosfato diamónico) como fuente de nitrógeno, sin embargo este no se añadió durante la época lluviosa por falta de este insumo, en la época fría sí se adicionó, aunque en cantidad insuficiente. Se carece de control de la temperatura en la etapa de reactivación y propagación del fermento. El pH del fermento reactivado fue mayor en la época fría (5.1) que en la época lluviosa (4.6), probablemente a la mayor acumulación de ácidos orgánicos de la materia prima, pues es la época metabólicamente más activa. La concentración de AF en los jugos frescos de la molienda utilizados en la reactivación y propagación, revela el efecto ambiental, siendo para la época lluviosa la menor concentración registrada (7.84 %), que la fría (12.24 %). Esta concentración del jugo fresco de la molienda es la usada al inicio de la reactivación y propagación del fermento en cada época, es indebidamente más alta (53 % en promedio) que la concentración óptima (6.5 %) usada en producción de tequila. Las condiciones adversas (carencia de nitrógeno en la época lluviosa y el estrés térmico en la fría), impidieron reconocer objetivamente otros efectos e inhibición del desarrollo de la levadura (densidad microbiana) debido al efecto ambiental y la concentración elevada del sustrato. Regularmente en la época fría se calientan los jugos de la molienda con vapor si su temperatura es menor a 30 °C. La relación de los °Brix medidos con refractómetro digital y la cuantificación de AF por cromatografía líquida de alta presión, presentaron una correlación positiva altamente significativa, lo cual respalda la conveniencia de utilizar un refractómetro digital como instrumento de medición más confiable para el ajuste de las concentración de AF en los jugos frescos de la molienda, con base la ecuación de regresión correspondiente. La caída del pH durante la fermentación en ambas épocas coincide con el mayor consumo de AF, lo cual ocurrió entre las 3 y 18 h de fermentación. Las poblaciones microbianas consumieron más fructosa que glucosa, por lo que esta última se presentó en mayor proporción al final de la fermentación. El porcentaje de utilización de fructosa y glucosa fue en promedio de 90 y 37 % respectivamente.

3.1 Introducción

El maguey ha sido por mucho tiempo de gran importancia económica para las poblaciones rurales del altiplano potosino (Tello y García, 1985), pues en particular el maguey mezcalero (*Agave salmiana*) es de los pocos recursos bióticos abundantes y disponibles en la región que se destina principalmente como materia prima para la elaboración de mezcal. En la región, la industria mezcalera “ha tenido numerosas épocas de auge y decadencia, pero nunca debido a la falta de materia prima, sino por razones económicas y culturales” (Aguirre *et al.*, 2001: 84); esto ha repercutido en el deterioro del conocimiento tradicional sobre el manejo de magueyeras y el proceso de elaboración de mezcal (Aguirre, 2009).

En la actualidad el proceso de elaboración de mezcal potosino, difiere del proceso tradicional del “vino mezcal” de las antiguas haciendas potosinas descrito por don Aniceto Ortega, y documentado en 1864 por don Manuel Payno en su “Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos”. De la misma manera, se diferencia de los procesos descritos en los estudios realizados en varias fábricas de mezcal del altiplano potosino por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) (Núñez y Arellano, 2000), después de su última reapertura en los noventa.

En 2001 Aguirre *et al.* evaluaron indirectamente el proceso de elaboración de mezcal de la fábrica “Laguna Seca”, en comparación con algunos datos disponibles para maguey tequilero; la evaluación mostró una ineficiencia del 100 % obtenida de la suma de ineficiencias de cada una de las etapas del proceso. Esta fábrica hasta hoy ha sido de las pocas que han trabajado continuamente, aunque al mínimo de su capacidad instalada.

Por lo anterior, Aguirre *et al.* (2001) expusieron la necesidad del estudio del proceso de elaboración de mezcal potosino para atender urgentemente la problemática de cada una de las etapas del proceso, ya que significan pérdidas económicas para la industria mezcalera, y determinantes para la estandarización tanto del proceso como del producto. De esta manera la reciente y creciente demanda nacional e internacional de aguardiente de maguey (Varela, 2012), junto con la elaboración competitiva de nuevos productos del

maguey representan una oportunidad de desarrollo para las poblaciones rurales, y la revalorización del recurso por el cual se paga un bajo precio (Aguirre *et al.*, 2001).

Actualmente se carece de información en detalle del proceso de elaboración del mezcal potosino y por consiguiente, de la fermentación alcohólica, etapa crítica en la elaboración de bebidas alcohólicas, ya que de ella depende en gran medida el rendimiento y calidad del destilado (Cedeño, 2003; Fleet, 2003). Las condiciones ambientales (particularmente la humedad y la temperatura) también tienen ciertos efecto sobre la fermentación, pues repercuten en la calidad de la materia prima y por lo tanto en la composición del sustrato, y a la vez, en la temperatura de la cámara o nave de fermentación, la cual es crítica para el crecimiento y reproducción de la población microbiana deseable para el desarrollo de la fermentación alcohólica.

3.1.1 Materia prima y condiciones de fermentación en la fábrica de mezcal “Laguna Seca”

La fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca” reinició operaciones a principios de los noventa, aunque a la fecha siguen con problemas de ineficiencia; esta fábrica tiene una estructura abovedada que alberga tres secciones o cámaras en desnivel para el transvase de líquidos por gravedad; en la más alta de estas secciones se realiza la molienda, y en las siguientes la fermentación y destilación respectivamente. Los hornos de vapor y de leña, donde se realiza la cocción de las cabezas de maguey, se encuentran dispuestos a los costados de la construcción abovedada. Propiamente en el altiplano potosino, este tipo de fábrica fue construido dentro de las antiguas haciendas y diseñado con un cierto enfoque industrial (Gschaedler, 2007).

Las etapas del proceso actual de elaboración del mezcal potosino siguen siendo las mismas del proceso tradicional, aunque con algunas diferencias notables, específicamente en la calidad de la materia prima, la fermentación alcohólica y el volumen de producción (Payno, 1864; Núñez y Arellano, 2000).

Históricamente la castración del maguey ha sido la manera de regular la disponibilidad con calidad de la materia prima, pues se realiza en el umbral de madurez de la planta, con la finalidad de impedir su floración, y al retrasar su senectud y muerte se amplía hasta dos

años la oportunidad para aprovecharlo. Esta actividad junto con el trasplante de hijuelos permitían asegurar el abastecimiento regular de materia prima durante todo el año (Bazant, 1980; Aguirre *et al.*, 2001).

Regionalmente el umbral de madurez del maguey se reconoce por las características del cogollo. Se llegan a distinguir cuatro estados de madurez del maguey: “castrado”, “quiotillo”, “quiotado” y “bruto” (Figura 3.1). El maguey castrado (maguey al cual se le retiró el meristemo apical antes de ser recolectado para evitar su floración y muerte) es el maguey maduro que después de castrarse podría tardar hasta dos años para ser recolectado, y adicionalmente era considerado como el mejor para producir mezcal. El maguey quiotillo o maduro (con adelgazamiento y acortamiento de las pencas del cogollo, y desprendimiento del meristemo apical al descogollarse) se caracteriza por su mayor acumulación de compuestos de reserva, con lo cual comienza la reproducción (Aguirre *et al.*, 2001). El maguey quiotado, es aquel que al comenzar a sobresalir su quiole, éste es destruido por animales o cortado intencionalmente. En la actualidad el desquiole se usa como práctica generalizada en el maguey tequilero y diversos magueyes mezcaleros de otras regiones, a pesar de la pérdida de reservas de la planta en la formación parcial del quiole (Aguirre *et al.*, 2001), lo cual no obstante es lo más conveniente en grandes plantaciones. El otro estado de madurez es el “tierno”, “bruto” o inmaduro (cogollo engrosado y apretado, y que requiere hasta más que dos años para alcanzar su madurez), el cual se considera el menos deseable, pues aunque puede ser hasta más grande que el maduro, al encontrarse aún en estado vegetativo presenta menor acumulación de compuestos de reserva (fructanos) y mayor cantidad de “guishe” (saponinas), por lo que el tamaño en esta especie, en su hábitat, es un indicador pobre de su madurez (Aguirre *et al.*, 2001).

Sin duda la madurez del maguey mezcalero potosino ha sido por mucho tiempo un indicador de calidad de la materia prima, pues el registro de este conocimiento tradicional habla de una comprensión de la fenología de la planta y de la práctica de la castración oportuna para impedir su floración (Payno, 1864; Bazant, 1980).

Al llegar al estado maduro, el maguey debe ser aprovechado en el momento o castrado para poder diferir su recolecta, pues durante la estación de crecimiento (mayores temperaturas y precipitaciones) éste es un estado fenológico efímero, ya que todas las reservas se canalizan rápidamente a la reproducción sexual. El poco éxito de la reproducción natural por semilla en ambientes deteriorados por la ganadería, causa que la floración de la planta sea infructuosa y que sólo se desaproveche el maguey (Aguirre *et al.*, 2001).

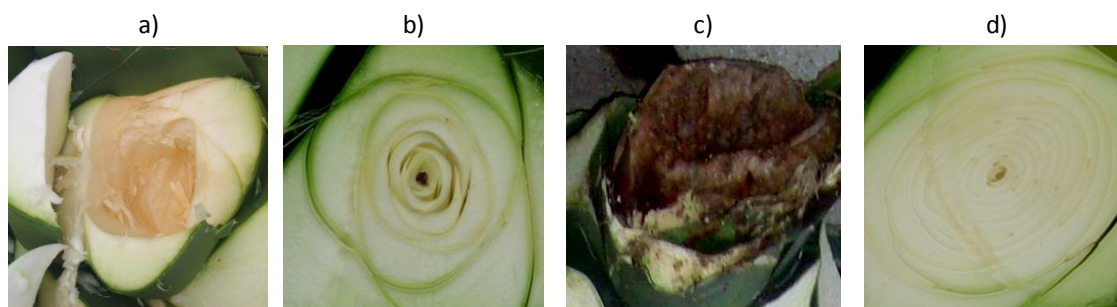


Fig. 3. 1 Características del corte transversal basal del cogollo de *Agave salmiana*: a) maguey recién castrado; b) maguey quiotillo, con pocas pencas sin desplegar y el hueco del meristemo del quiole; c) maguey desquiotado por depredación; d) maguey bruto, con abundantes pencas sin desplegar y el ápice vegetativo persistente.

Actualmente se recolectan magueyes quiotillos y en menor proporción magueyes desquiotados; sin embargo la presencia de maguey tierno en las cargas bajo proceso, se debe al descuido y falta de supervisión del personal que realiza esta labor. Esto puede inhibir radicalmente la fermentación, pues la riqueza de saponinas en los jugos extraídos, tiene un efecto letal para la población microbiana (levaduras) productora de etanol (Aguirre *et al.*, 2001; Zamora *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la fermentación alcohólica, según don Aniceto Ortega (Payno, 1884), su preparación implicaba la raspa de magueyes y la extracción de su savia durante 15 días, colocándola en pilas de mampostería o pieles de res que servían de recipientes, en cuyo fondo se colocaban raíces de alguna leguminosa (mezquite o huizache). Después de este tiempo se incorporaba el jugo y bagazo extraído de las cabezas de maguey cocidas, para

que comenzara la fermentación; el indicativo de su término era cuando descendían la espuma y parte del bagazo flotante en la superficie de la pila.

Se desconoce el tiempo o duración que requería esta fermentación, y se puede suponer que el uso del aguamiel, previo a la fermentación, sustrato rico en carbohidratos, sales minerales y factores de crecimiento, servía como medio favorable para la proliferación de microorganismos (bacterias y levaduras) (Lappe *et al.*, 2008). El uso de raíces de leguminosas probablemente tenía una función catalizadora de la fermentación, aunque también se sospechaba que bastante levadura quedaba adherida a dichas raíces en el fondo, al término de la fermentación, lo cual facilitaba fermentaciones consecutivas (Payno, 1864). Lo anterior llega a tener sentido desde el punto de vista industrial, pues de esta manera se obtenía suficiente microbiota capaz de multiplicarse para fermentar el sustrato rápidamente. Posiblemente la manera como se preparaba la fermentación es análoga a lo que ahora se conoce en la industria del tequila y mezcal como “inóculo” o caldo microbiano, el cual es un fermento reciclado o propagado antes de su incorporación a las pilas de mampostería o tanques de fermentación, aunque ya sin el uso de aguamiel. Actualmente en la fábrica de mezcal Laguna Seca, el caldo microbiano o de fermento se prepara dentro de la cámara de fermentación, escalando en dos etapas su crecimiento en volúmenes de jugo fresco aproximados de 100 y 1000 L, respectivamente antes de ser incorporado a la pila de fermentación (Figura 3.2).

Primeramente se prepara lo que el personal técnico de la fábrica denomina “pie de cuba”, en un tambo de plástico de 200 L, vertiendo tres garrafas, aproximadamente 12 L, de fermento (cepa nativa reciclada) de la carga anterior, conservado en refrigeración a 5 °C, para lo cual dicho volumen es aforado a la mitad de la capacidad del tambo con jugo fresco de la molienda con aproximadamente 12-15° Brix, se añade aproximadamente 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (fosfato diamónico) como fuente de nitrógeno, y se aplica aireación continua durante 12 h. Esta última práctica es reciente y se realiza con el fin de incrementar la densidad de levaduras (crecimiento y multiplicación) en presencia de oxígeno, y de fermentar en ausencia de él, cuando la energía que adquiere del sustrato se

canaliza a la producción de compuestos metabólicos (etanol, CO₂, glicerol, ácidos orgánicos, etc.).

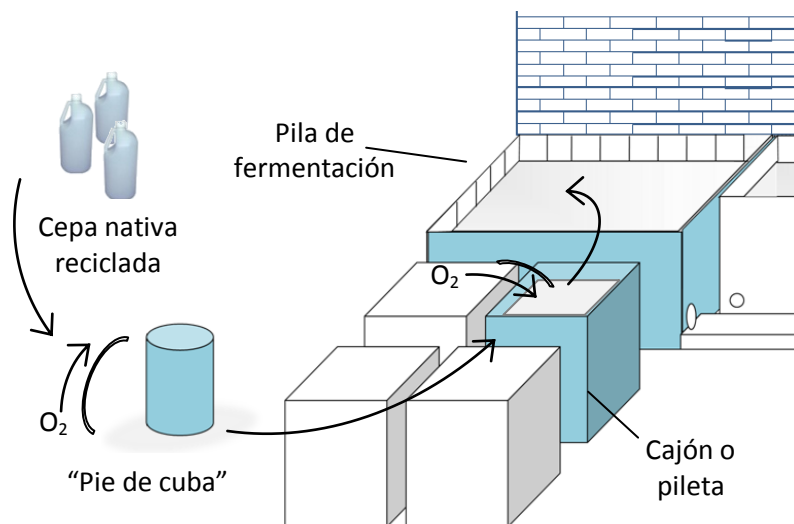


Fig. 3. 2 Desarrollo del caldo microbiano para la fermentación alcohólica, de acuerdo con el personal técnico de la fábrica de mezcal Laguna Seca.

Después de 12 h el caldo reactivado se vierte a una pila pequeña de mampostería, denominada "cajón" o "pileta" para escalar su crecimiento a un volumen aproximado a 1000 L, nuevamente aforado con jugo fresco de molienda, y se suministra aireación constante por 12 h, pero ahora sin aporte de nitrógeno.

Luego, el caldo de fermento es trasvasado a la pila de fermentación para mezclarse con el jugo de molienda, el agua de lavado del bagazo y por último se puede añadir agua para ajustar la mezcla a 8° Brix; esta medición se realiza con un sacarímetro tipo densímetro, el cual se basa en la densidad relativa de soluciones de sacarosa. La temperatura de los jugos se ajusta con vapor si es menor que 30° C, y se agrega la fuente de nitrógeno (cerca de 1.2 kg para la pila de fermentación, esto es, aproximadamente 0.20 g/L de fosfato diamónico) para que comience la fermentación. El término de la fermentación se reconoce por el descenso de la capa de espuma en la superficie de la pila. Actualmente la fermentación en Laguna Seca se realiza sin el bagazo generado en la molienda, no obstante, esta práctica persiste todavía en algunas fábricas, pues originalmente era la forma generalizada como se realizaba esta etapa del proceso.

3.1.2 Épocas o estaciones funcionales en relación con el maguey (*Agave salmiana*)

Las condiciones ambientales en función del tiempo y del espacio, determinan ciertos patrones en su manifestación que repercuten sobre la biota; en particular "el maguey mezcalero presenta un ajuste funcional muy preciso a ellas (particularmente a la humedad y a la temperatura)" (Aguirre *et al.*, 2001: 61). Así, Aguirre *et al.* (2001) reconocieron tres épocas o estaciones funcionales del maguey, con base en observaciones de campo y patrones climatológicos:

La primera estación del año se inicia en marzo y termina en junio; se caracteriza por registrar las temperaturas más altas del año y el mayor déficit de humedad aprovechable. En este período florecen los magueyes que comenzaron a formar sus quíotes en la estación siguiente, pero del año previo; el resto de magueyes se mantienen en latencia, sin desarrollo foliar y utilizando parte de sus reservas para el mantenimiento de sus funciones vitales mínimas. Como síntomas del déficit hídrico, hacia el final del período las pencas se pliegan longitudinalmente y toman aspecto acanalado, se enjuntan (arrugan) en la base y en casos extremos se pueden colapsar.

La segunda estación funcional se inicia en julio y termina en octubre. En este período se presentan las temperaturas más moderadas del año, debido a la mayor nubosidad y la presencia de la mayor parte de la precipitación anual. En concordancia los magueyes manifiestan su mayor actividad, pronto recuperan su turgencia después de las primeras lluvias, es muy evidente el desplegado de nuevas pencas del cogollo, y hacia el final del período comienzan a manifestarse los quíotes por encima de la punta del cogollo, lo cual posiblemente coincida con la reposición total de las reservas consumidas en la estación previa y con su incremento neto.

Finalmente, la tercera estación funcional comienza en noviembre y termina en febrero. En este período se presentan las temperaturas más bajas, lo cual limita el crecimiento aunque exista humedad disponible en el suelo (particularmente por

el efecto de los vientos fríos del norte, los “nortes”), pero a la vez reduce las necesidades de mantenimiento; así las reservas acumuladas durante el período precedente de máxima actividad, no solo no se consumen sino que posiblemente se incrementen. Los quiotes continúan desarrollándose hasta alcanzar su altura máxima a finales de la temporada para comenzar a florecer en el siguiente período (p. 61-62).

Estas tres épocas o estaciones funcionales influyen marcadamente sobre la succulencia y riqueza de reservas del maguey y por lo tanto, en las características de los jugos extraídos. De igual manera, la variación de la temperatura durante el año también repercute sobre el microclima de la cámara de fermentación, e indudablemente en la propagación de la levadura y la fermentación alcohólica.

Con base en lo precedente, este trabajo pretende entender y explicar cómo ocurre la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal potosino, y su posible relación con las épocas o estaciones funcionales, y con base en ello establecer las prácticas para su estandarización. A la vez, con ello se puede mejorar el proceso en general, al vincular la fermentación con la mejora de las otras etapas del proceso (Zamora, 2012).

Este trabajo es complementario de la tesis doctoral de Zamora Pedraza, titulada “Diagnóstico del proceso actual de elaboración de mezcal en la empresa “Laguna Seca” y alternativas para mejorar su eficiencia”, con quien en forma conjunta se realizaron los muestreos de lotes completos del proceso de elaboración de mezcal.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la fermentación alcohólica en la elaboración de mezcal potosino, en dependencia de la época del año, a través de las variables de pH, °Brix, porcentaje de azúcares fermentables (% AF), temperatura, nitrógeno, densidad microbiana y etanol, y con base en esta información establecer las condiciones actuales de fermentación en la fábrica, y reconocer sus principales deficiencias para diseñar la parte experimental del siguiente capítulo.

3.2 Materiales y métodos

El estudio sólo se pudo realizar durante las épocas lluviosa de 2009 y fría de 2011, en la fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca” (Figura 3.3), la cual está ubicada en el

ejido Miguel Hidalgo, Charcas, San Luis Potosí (23° 17' 44'' de latitud Norte, 100° 55' 49'' de latitud Oeste y 1962 msnm). Un cambio coyuntural en las operaciones en la fábrica durante la época seca, llevó a suspender los dos muestreos faltantes de dicha época, pues dejarían de ser comparables, sin embargo, en los cuadros se pone alguna información del registro del único lote de la época únicamente como referente, sin incluirlo dentro del análisis estadístico de las otras dos épocas. El análisis de las muestras se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Fig. 3. 3 Fábrica de mezcal de la ex hacienda “Laguna Seca”, Charcas, S L P (Fot.: Anónimo, 2009).

Para este trabajo se hizo el seguimiento detallado de tres lotes o fermentaciones completas, incluyendo también la propagación de los caldos microbianos de de las épocas lluviosa y fría, y uno de la época seca; con ello se buscó establecer las posibles diferencias en eficiencia entre fermentaciones de una misma estación funcional y entre estaciones en el año. La eficiencia de la fermentación se evaluó a través del rendimiento de etanol por unidad de azúcares fermentables en los jugos, y la cantidad de azúcares residuales o sin fermentar al término de la misma.

3.2.1 Obtención de muestras

El muestreo de los caldos microbianos se realizó para el pie de cuba cada hora, y para el cajón o pileta cada hora y media. Su muestreo por triplicado se realizó con un recipiente de plástico, pues como el caldo tienen aireación constante, no se requirió homogeneizarlo.

El muestreo de los jugos en la pila de fermentación se realizó desde el inicio hasta el término de este proceso, cada tres horas, a tres profundidades (partes alta, media y baja), y cerca de las cuatro esquinas de la pila, pues se carece de agitación. Para la obtención de estas muestras se utilizó un dispositivo desarrollado para este propósito (Figura 3.4), el cual consta de un bastón con tres tubos idénticos ajustables a cada nivel de profundidad del líquido, y un mango deslizable de apertura (toma de muestras) y cierre de los tubos conteniendo cada muestra. Para ello primero se ajustó la altura de cada tubo, de acuerdo con la profundidad de los jugos en fermentación de cada carga; luego el bastón se introdujo, lentamente en posición “cerrado” a la pila de fermentación, hasta tocar el fondo, se accionó el mango a la posición “abierto” y se esperó 10 segundos para su llenado, y finalmente se puso el mango nuevamente en posición cerrado antes de retirar el bastón con las tres muestras.



Fig. 3. 4 Dispositivo para el muestreo simultáneo en tres profundidades de la pila con jugos en fermentación alcohólica.

Inmediatamente después de extraídas, a las muestras se les midió la temperatura (termómetro Brannan, Termolab, México), y el pH (potenciómetro digital HANNA Instruments, 98127, Italia); luego se filtraron y se registró la lectura de °Brix (refractómetro digital LEICA AR200, USA). Posteriormente estas muestras fueron congeladas y trasladadas al IIZD. En el laboratorio las muestras fueron descongeladas y

centrifugadas (Thermo IEC Centra CL3R, USA) a 4000 rpm por 15 min; en el sobrenadante se cuantificó la concentración de azúcares fermentables por cromatografía líquida de alta presión CLAP (Agilent, HP 1100, Alemania), nitrógeno amoniacal por espectrofotometría (Agilent HP 8453 UV visible, Alemania), y compuestos volátiles (etanol y metanol) por CG (Agilent HP 5890). El sedimento se utilizó para el recuento de levaduras en la cámara de Neubauer (España); estos métodos empleados para las mediciones y cuantificaciones analíticas se enumeran en el Cuadro 3.1 y se presentan en detalle en el Apéndice A.

3.2.2 Análisis estadísticos

Los datos se analizaron de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, con tres repeticiones (tres lotes); se consideró como único factor la época o estación funcional (lluviosa y fría). Se utilizó el procedimiento GLM y la prueba de comparación de medias LSMEANS, con la opción REPEATED del paquete estadístico SAS, para el análisis de variación (Littell *et al.*, 1998).

Los valores medios de cada variable (temperatura, pH, % AF, nitrógeno y densidad microbiana) y su error estándar se graficaron con respecto al tiempo para obtener la cinética, tanto de los caldos microbianos o fermentos como de los jugos sometidos a fermentación alcohólica, con la ayuda del programa SigmaPlot 9.0.

Con los datos de las condiciones iniciales de la fermentación se realizó un análisis de variación de un solo factor (época).

Cuadro 3. 1 Métodos analíticos para la cuantificación de las variables evaluadas.

Mediciones	Método	Apéndice
Densidad microbiana	Recuento en cámara de Neubauer (Anónimo, 2010)	A-1
Azúcares fermentables	Cromatografía líquida (CLAP) (Michel <i>et al.</i> , 2008)	A-2
Nitrógeno	Método del fenato (Arrizon, 2000)	A-3
Compuestos volátiles	Cromatografía de gases (CG) (Díaz de León, 2006)	A-4

3.3 Resultados y discusión

En la fábrica de mezcal Laguna Seca se ha trabajado durante los últimos 19 años bajo condiciones precarias y a un mínimo de su capacidad instalada; además de diversos

problemas técnicos por carencia de capital, presenta diversas deficiencias por falta de control y estandarización en sus procesos, que en la situación actual limitan su rentabilidad y rendimiento de mezcal (Aguirre *et al.*, 2001).

En los procesos de fermentación estudiados se registró el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (fosfato diamónico) como fuente de nitrógeno; este compuesto provee de iones amonio a la célula y la mayoría de las levaduras lo utiliza de manera eficiente; sin embargo, la cantidad usada fue menor que 0.20 g/L en la reactivación de los caldos microbianos, y lo aplicado en la fermentación resultó inconmensurable por el método del fenato, con una curva de calibración de 10 a 50 mg/L del ion amonio usando un estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Jalmek). Por otro lado, el nitrógeno sólo se añadió durante la época fría, pues en la época lluviosa la reactivación y propagación de los fermentos y la fermentación se realizaron sin este insumo. Como ya se mencionó, el nitrógeno es muy importante en condiciones aerobias para el crecimiento y reproducción de la levadura (Russell, 2003; Jiménez y lí, 2008), cuya abundancia es necesaria para iniciar la fermentación alcohólica adecuada. En condiciones anaerobias el amonio sirve como transportador de la fuente de carbono (monosacáridos) hacia el interior de la célula para la obtención de energía, pero también es esencial para la síntesis de proteínas, aminoácidos, enzimas y algunas vitaminas, y está involucrado en la producción de compuestos metabólicos (alcoholes superiores, ácidos orgánicos, etc.) (Walker, 1998); en ambas rutas metabólicas el nitrógeno es indispensable para una fermentación alcohólica eficiente.

Respecto a las demás variables evaluadas, primeramente se presentan las gráficas de los datos registrados durante la reactivación y propagación de los fermentos o caldos microbianos en dos partes, lo correspondiente a lo que en la fábrica denominan “pie de cuba” o tambo, y después las del “preinóculo” o cajón. Luego se muestran las gráficas con los datos de la fermentación alcohólica.

3.3.1 Reactivación del caldo microbiano (“pie de cuba” o tambo)

Temperatura. La temperatura durante la reactivación del caldo microbiano en la época lluviosa fue superior ($p < 0.01$) a la registrada durante la época fría (Figura 3.5), en concordancia con las diferencias en la temperatura ambiental, ya que se carece de control

térmico adecuado para el mejor crecimiento y reproducción de la levadura. La reactivación de los caldos microbianos se realiza dentro de la cámara de fermentación, esto es, con mucho menores oscilaciones térmicas que a la intemperie, y únicamente se añade jugo fresco de la molienda a unos 20 °C en la época fría, pero que al término de la reactivación el caldo sólo tenía 15 °C, temperatura por debajo de la considerada como óptima para el crecimiento poblacional de la levadura (25 - 30 °C) (Russell, 2003). Bajas temperaturas condicionan el crecimiento y reproducción de la levadura y constituyen uno de los principales factores de estrés; aunque sólo permiten el crecimiento muy lento (Matthew *et al.*, 2007; Arellano *et al.*, 2008), éste entonces depende más de la disponibilidad de nitrógeno. El estrés térmico en la época fría, puede estar favoreciendo a individuos de la microbiota con mayor contenido de ácidos grasos en la membrana plasmática, lo cual mejora su permeabilidad y tolerancia al etanol (Leveau *et al.*, 2000). Esta selección de levaduras bajo condiciones de estrés térmico, puede conducir a desarrollar cepas tolerantes a niveles más altos de etanol, pero en las condiciones actuales, con los cambios estacionales, probablemente sólo contribuye a mantener la diversidad media anual del fermento utilizado. Esta diversidad de especies en fermentaciones alcohólicas poco estandarizadas se encuentra estrechamente relacionada con la composición química del destilado (Fleet *et al.*, 1984; Walker, 1998; Russell, 2003; Cedeño, 2003; Arrizon *et al.*, 2006; Lappe *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2008).

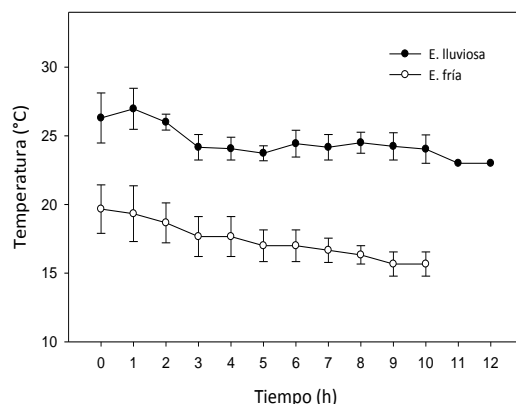


Fig. 3. 5 Variación de la temperatura durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

pH. El pH del fermento reactivado fue mayor ($p < 0.01$) en la época fría que en la época lluviosa (Figura 3.6); esta diferencia probablemente es debida a que la materia prima en esta última época presenta mayor acumulación de ácidos orgánicos, al ser la época metabólicamente más activa debido a la coincidencia de la mayor precipitación y temperaturas altas en el año.

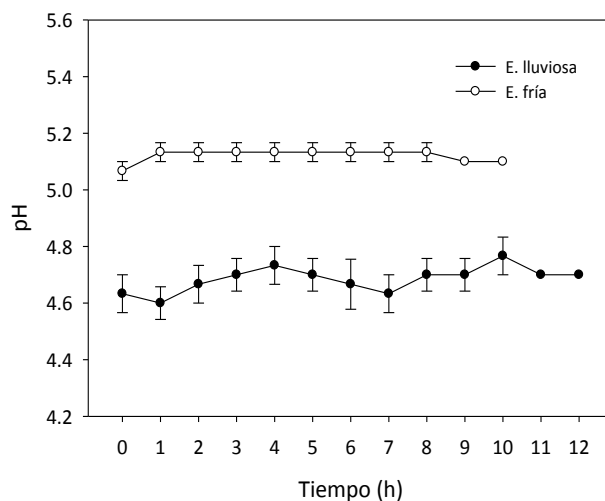


Fig. 3. 6 Variación de la reacción durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

Cabe señalar que el nitrógeno sólo se añadió durante la época fría, y lejos de que el pH disminuyera por una mayor actividad metabólica de la microbiota, entonces se registró el mayor pH. Todo indica que la diferencia estacional en el pH de los jugos de molienda es debida al efecto ambiental sobre la calidad de la materia prima, es decir, en la composición y concentración de los jugos extraídos.

Porcentaje de azúcares fermentables (fructosa y glucosa). Cabe señalar que la cuantificación de azúcares fermentables sólo se realizó para fructosa y glucosa, por ser estos los monosacáridos principales presentes en los jugos de maguey (*A. salmiana*) cocido (Michel *et al.*, 2008); así, para este estudio y por su concentración mínima se excluyeron otros azúcares como la sacarosa, xilosa y maltosa.

Como en la preparación del fermento se utiliza únicamente jugo fresco de la molienda, es evidente el efecto ambiental debido a la mayor succulencia del maguey durante la época

lluviosa; esta mayor succulencia se traduce en una dilución de los compuestos sintetizados por la planta, representados gráficamente con diferencias significativas. En la época fría los jugos frescos de molienda usados para la reactivación del fermento contenían 12.24 ± 1.087 % de azúcares fermentables (AF), en cambio en la época lluviosa sólo presentaron 7.84 ± 0.177 % AF (Figura 3.7).

Lappe *et al.* (2008) señalan la poca información disponible sobre el cultivo y propagación de poblaciones de levaduras; estos autores, documentan que para el caso de tequila, bajo condiciones óptimas, la concentración del sustrato ajustado para propagación del fermento es entre 50 - 80 g/L, equivalentes a entre 5 - 8 % (en promedio 6.5 %), aunque no señalan hasta cuánto disminuye la concentración al final de la propagación. En efecto, en la producción de etanol a partir de melazas, Russell (2003) considera el uso de bajas concentraciones de AF al inicio de la propagación y su disminución hasta 0.5 % (sustrato residual) al final de la misma, para obtener un buen crecimiento y multiplicación de las levaduras. Así, la concentración registrada al inicio de la preparación del fermento en la época lluviosa y fría excede en 88 % y 53 %, respectivamente a la concentración considerada como óptima para la propagación de levaduras para tequila.

En la época lluviosa se registró un porcentaje de consumo del 24.9 % y en la época fría del 27.3 % del sustrato inicial. Probablemente estos porcentajes bajos de consumo de AF por las poblaciones microbianas en la reactivación del fermento con respecto al registrado en tequila (92.3 %), se deban de manera conjunta a las condiciones de estrés térmico en la época fría, la alta concentración del sustrato y la ausencia o insuficiencia de nitrógeno.

Respecto al contenido de fructosa y glucosa (Figura 3.8 y 3.9), la tendencia del bajo consumo es la misma; sin embargo, estas moléculas se encuentran en proporciones diferentes en los jugos frescos al inicio de la reactivación de cada época. En la época lluviosa se registró una proporción de 2:1 de fructosa:glucosa mientras en la fría de 3:1, probablemente sea al mismo efecto ambiental sobre la materia prima.

Densidad microbiana (Log células/ml). La densidad microbiana (levaduras) en ambas épocas tuvo su punto máximo en cerca de 7.6, correspondiente a 44×10^6 levaduras/ml. Esta densidad al verterse a la pileta o “cajón” y al aforarse nuevamente con

jugo fresco de la molienda a una capacidad del 80 % (800 L) representa una concentración de 5.5×10^6 levaduras/ml. (Figura 3.10).

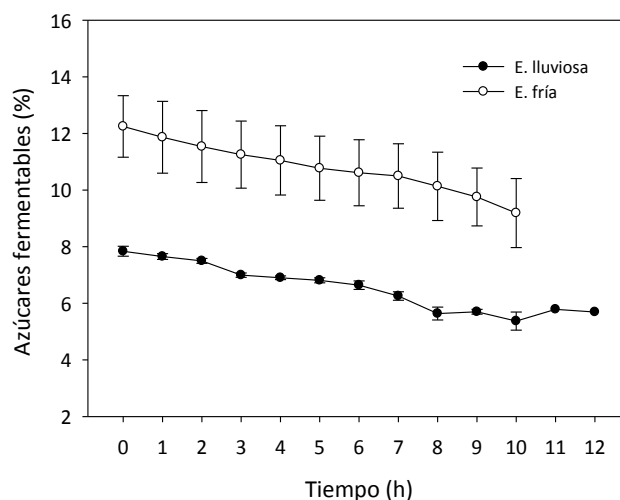


Fig. 3. 7 Consumo de AF durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

Sin embargo, en ambas épocas estudiadas se tuvieron factores negativos; en común para las dos fue la alta concentración de sustrato al inicio de la reactivación del fermento; particularmente en la lluviosa hubo ausencia de nitrógeno, y en la fría, las bajas temperaturas. Esto dificultó su comparación y reconocer algún efecto estacional en el crecimiento microbiano.

3.3.2 Propagación del caldo microbiano (“preinóculo” o cajón)

Al prepararse de la misma manera que el “pie de cuba” o tambo, en la segunda parte etapa de la preparación del caldo microbiano, las variables evaluadas volvieron a presentar las tendencias registradas en la etapa previa de reactivación del fermento. Así, las diferencias registradas entre épocas ($p < 0.01$) para temperatura, pH y AF (Figura 3.11, 3.12, 3.13) son también atribuibles al efecto de la época o estación del año.

Respecto a la densidad microbiana, al igual que en su reactivación y la propagación del fermento se realizó bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas, sustrato muy concentrado, y por ausencia en la época lluviosa e insuficiencia en la época fría de nitrógeno, lo cual limitó el crecimiento y reproducción adecuado de las levaduras.

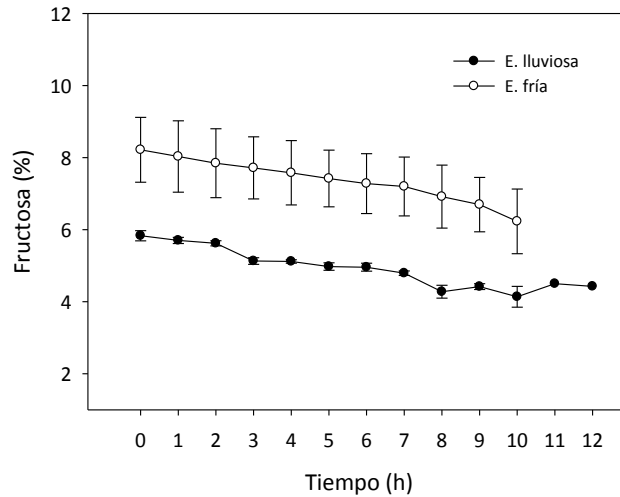


Fig. 3. 8 Consumo de fructosa durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

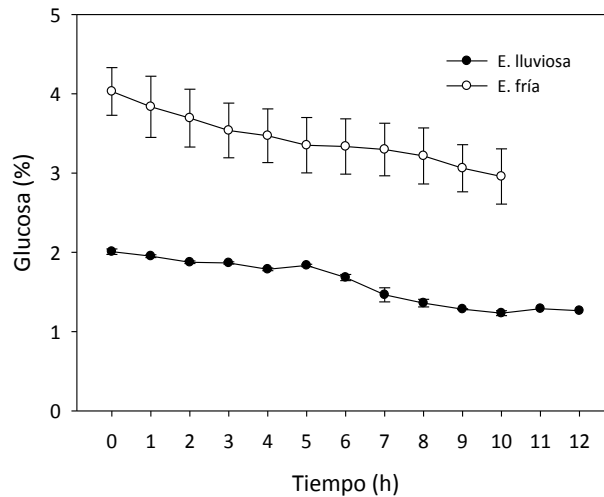


Fig. 3. 9 Consumo de glucosa durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

El volumen de la pileta o “cajón” (800 L) representa aproximadamente el 12 % del volumen promedio de los jugos a fermentar (6500 L). En promedio, el crecimiento final de la propagación del caldo microbiano en las dos épocas fue cerca de 43×10^6 levaduras/ml (Figura 3.11). Esta densidad es baja comparada con la del caldo microbiano para tequila ($200\text{-}300 \times 10^6$ levaduras/ml), añadido como 10 % del volumen total de los tanques de fermentación (Cedeño, 2003). La densidad aparente promedio alcanzada en ambas épocas

referida al volumen promedio (6500 L) de los jugos a fermentar, es apenas 5.3×10^6 levaduras/ml, con las cuales inició la fermentación. La diferencia entre la densidad de levaduras añadida y la densidad de levaduras en los jugos en el tiempo cero de la fermentación alcohólica, es la concentración de levaduras aportada por el propio ambiente.

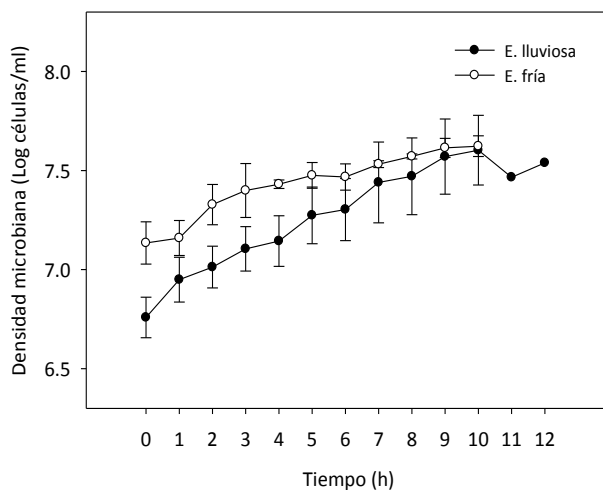


Fig. 3. 10 Variación de la densidad microbiana (levaduras) en escala logarítmica durante la reactivación del caldo de fermento, “pie de cuba” o tambo, en dos épocas funcionales del año.

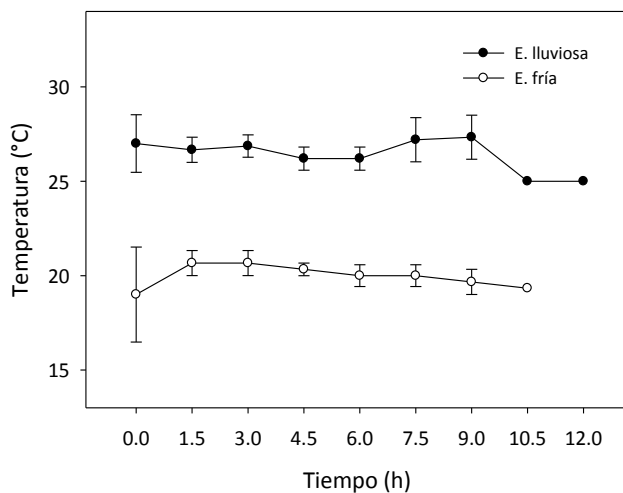


Fig. 3. 11 Variación de la temperatura durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.

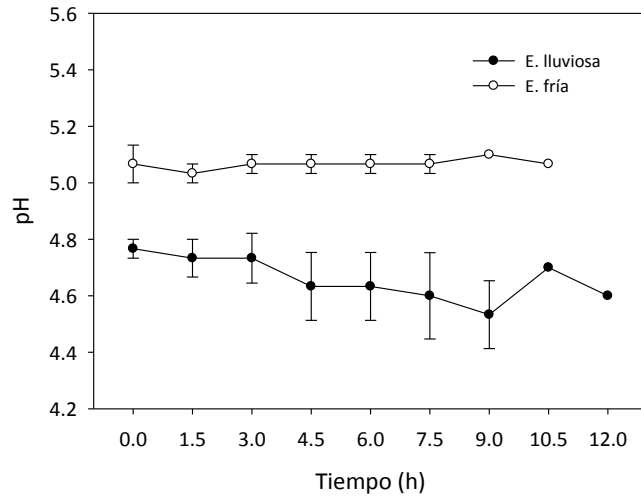


Fig. 3. 12 Variación de la reacción durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.

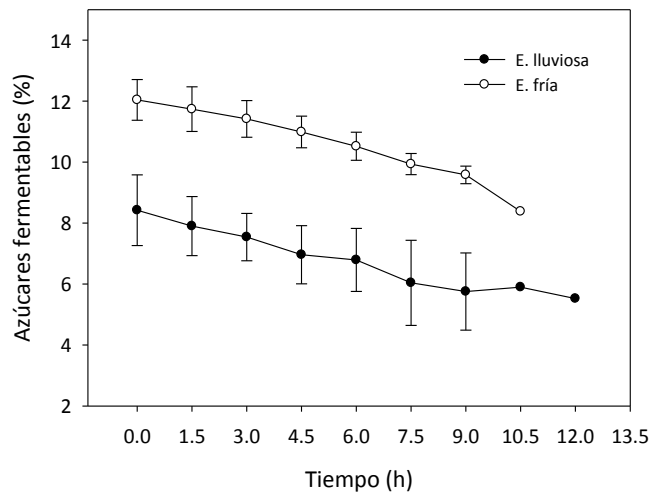


Fig. 3. 13 Consumo de AF durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.

3.3.3 Fermentación alcohólica

En el Cuadro 3.2 se presentan las condiciones iniciales de cada fermentación estudiada. En la fábrica de mezcal se tienen cuatro pilas de mampostería para la fermentación con capacidad algo diferente entre ellas, pero a su 90 % suman un volumen total aproximado de 30 000 L. Actualmente el volumen promedio que se dispone a fermentar por lote o

carga completa de un horno de vapor, es de unos 6500 L, volumen que varía de acuerdo con la eficiencia de las tapas previas y la época del año.

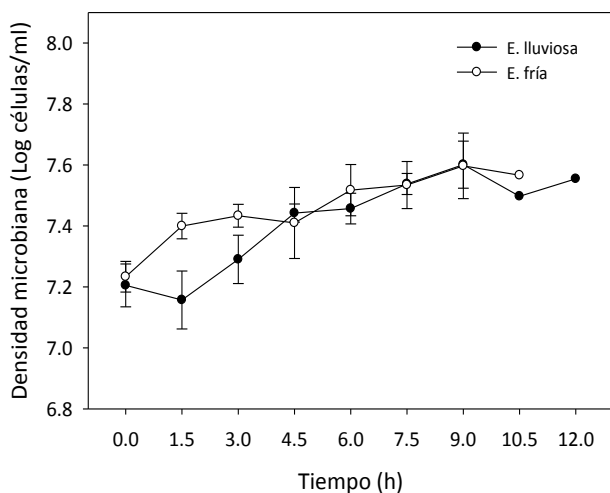


Fig. 3. 14 Densidad microbiana en escala logarítmica durante la propagación del caldo microbiano, “preinóculo” o cajón, en dos épocas funcionales del año.

La duración de la fermentación en la época lluviosa fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que en la fría, con tiempos promedio de 39 y 35 h, respectivamente; cabe señalar que en la época lluviosa no se añadió nitrógeno, debido a que no se contaba con este insumo. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos para fermentaciones de jugo de maguey y de uva (Arrizon y Gschaedler, 2007; Mendes *et al.*, 2004). Por otra parte, niveles bajos o ausencia de nitrógeno limitan el buen funcionamiento fisiológico de la levadura, reprimiendo su crecimiento, reproducción y tasa de utilización del sustrato (Russell, 2003); a la vez, el tipo de nitrógeno tiene ciertas implicaciones en la producción de compuestos aromáticos (Fleet, 2003), y en la síntesis de proteínas necesaria para el crecimiento de las levaduras.

Temperatura. En la Figura 3.15 se aprecia el efecto favorable del calentamiento de los jugos al inicio de la fermentación en la época fría, así como la incapacidad del sistema actual para igualar durante dicha época la temperatura deseable que sí se alcanza durante la época lluviosa. Así, el sistema (circulación de vapor a través de tubos situados en el fondo de las pilas) se debe rediseñar para que el calentamiento sea suficiente en la época fría del año.

Cuadro 3.2 Caracterización de la fermentación alcohólica en la fábrica de mezcal Laguna Seca en dos épocas funcionales del año.

Variable	Época Seca					Época lluviosa					Época fría					Probabilidad
	L-1	L-1	L-2	L-3	media	L-4	L-5	L-6	media	L-4	L-5	L-6	media			
Fecha	08/04/2009	08/08/2009	13/08/2009	19/08/2009		18/01/2011	23/01/2011	26/01/2011						-		
Volumen de la pila (L)	-	8113.00	6064.00	6653.00	6943.30	6454.00	6851.00	6256.00	6520.33					-		
Grados Brix	9.10	8.15	10.00	7.60	8.58	8.70	9.00	8.00	8.57					0.9840		
AF (%)	3.72	4.13	5.89	3.12	4.38	4.41	5.05	3.35	4.27					0.9133		
Temperatura (°C)	35.00	34.00	34.00	30.00	32.67	20.00	22.00	20.00	20.67					0.0013**		
pH	4.48	4.40	4.60	4.70	4.57	5.10	5.20	5.20	5.17					0.0031**		
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (mg/L)	trazas	s/a	s/a	s/a		trazas	trazas	trazas						-		
Densidad (Log levaduras/ml)	7.04	7.08	6.85	6.98	6.97	6.91	6.90	6.96	6.92					0.5270		
Duración (h)	27.00	39.00	39.00	39.00	39.00	33.00	36.00	36.00	35.00					0.0161*		
Mezcal destilado a 41 ° GL (L)	-	280	265	180	241.67	175	200	150	175.00					0.1240		

** p < 0.01
*P < 0.05

s/a : sin adición

pH. El pH de los jugos de maguey cocido en fermentación fue menor en la época lluviosa que en la época fría (Figura 3.16), debido probablemente al efecto ambiental que se refleja en los jugos frescos de la molienda. La caída del pH durante la fermentación en ambas épocas coincide con el mayor consumo de AF (Figura 3.17), lo cual ocurrió entre las 3 y 18 h, debido a la producción de ácidos orgánicos durante el metabolismo de la microbiota nativa.

Porcentaje de azúcares fermentables. El mayor consumo de AF por la población microbiana ocurrió entre las 3 y 18 h de fermentación y correspondió a la fructosa, pues la glucosa prácticamente quedó sin cambio al final de la fermentación (Figura 3.17). Este resultado es opuesto al generado por cepas de levaduras utilizadas en la fermentación de jugo de uva (Granchi *et al.*, 2003; Berthels *et al.*, 2004).

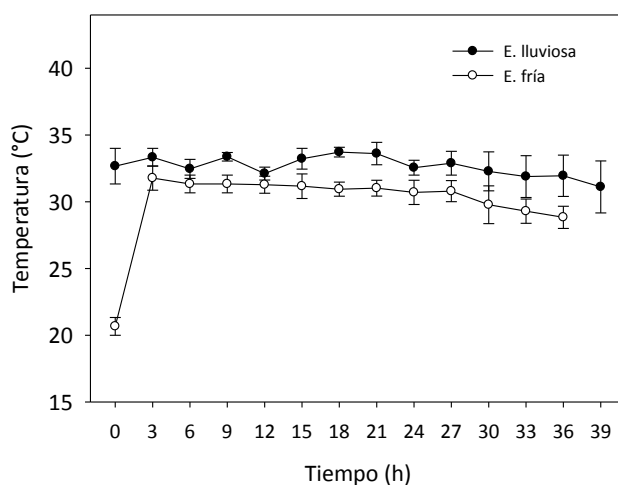


Fig. 3. 15 Variación de la temperatura durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

La disponibilidad dominante de fructosa permite suponer que las cepas nativas existentes en la fermentación de jugos de maguey cocido (*A. salmiana*) en la fábrica estudiada, y probablemente en donde se procesan algunas otras especies de maguey, han evolucionado para desarrollarse en este sustrato y ambiente asociado.

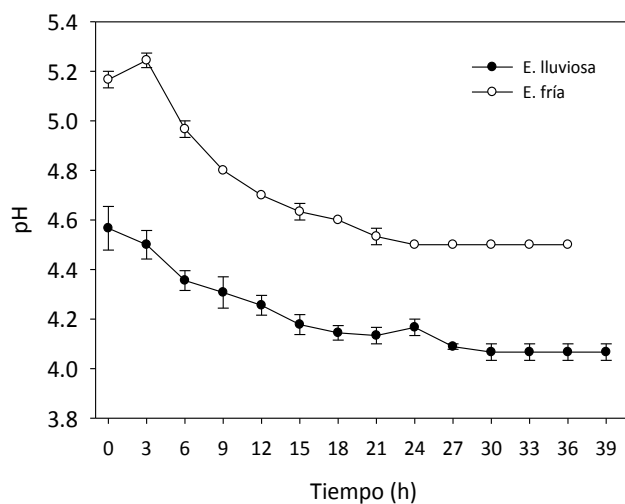


Fig. 3. 16 Variación de la reacción durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

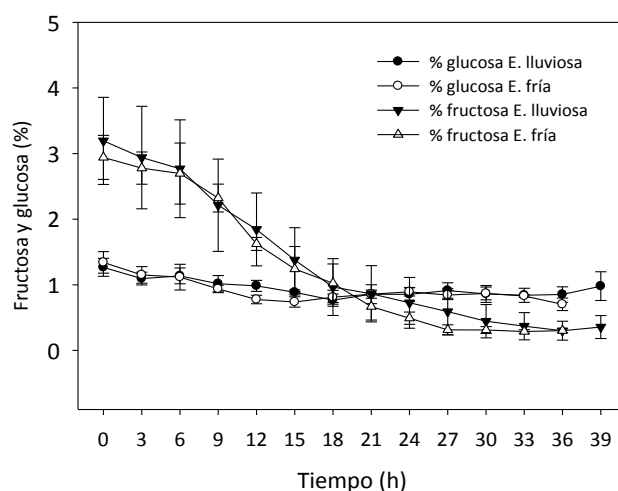


Fig. 3. 17 Consumo de AF durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

De acuerdo con los datos registrados de °Brix, medidos con el refractómetro digital, y las cuantificaciones por CLAP de fructosa y glucosa (AF), en la Figura 3.18 se puede observar la similitud de ambas mediciones de la concentración del sustrato al inicio de la fermentación para cada época (promedio de 4.5 % AF o de 8.5 °Brix), pero notablemente fueron mucho menor que los registrados para jugos de maguey tequilero, los cuales se ajustan a entre 10 y 14 % de AF o 16.5 ° Brix (Cedeño, 2003; Lappe *et al.*, 2008).

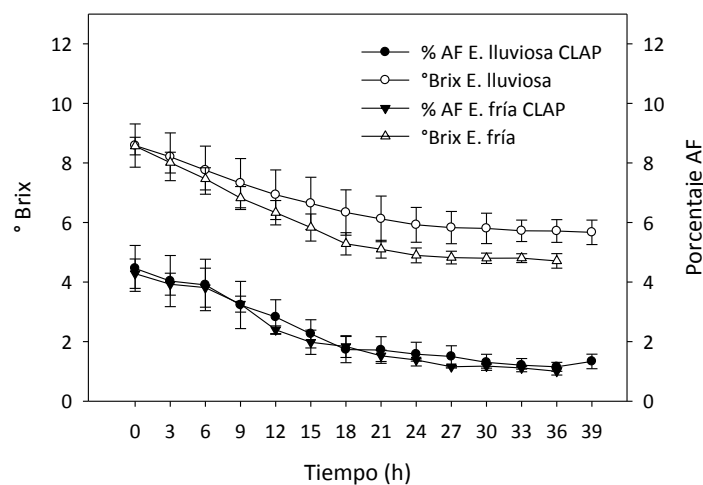


Fig. 3. 18 Variación en las mediciones de °Brix y de AF por CLAP, durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

En la misma gráfica se observa la tendencia decreciente similar de AF y °Brix en ambas épocas del año. A la vez resalta el paralelismo estrecho entre las curvas de °Brix y los porcentajes de AF, por lo que se procedió a formalizar la correlación entre ambos tipos de datos para los tres lotes y dos estaciones estudiadas (Cuadro 3.3), la cual fue altamente significativa.

Cuadro 3. 3 Análisis de correlación de las cuantificaciones de azúcares fermentables por CLAP con las mediciones con refractómetro digital.

Época	Lote	r	rc _{n-2, 0.01}
Lluviosa	1	0.979**	0.661
	2	0.979**	0.661
	3	0.969**	0.661
	Global	0.949**	0.393
Fría	1	0.981**	0.708
	2	0.976**	0.684
	3	0.967**	0.684
	Global	0.973**	0.418

** Correlación altamente significativa

El análisis de regresión lineal simple (Figura 3.19) muestra claramente que este tipo de refractómetro puede servir como instrumento de medición más confiable para ajustar la concentración de AF en los jugos frescos para la reactivación del fermento, su propagación

y la fermentación, que el sacarímetro tipo densímetro basado en la densidad relativa de soluciones de sacarosa, con menor capacidad de detección de diferencias por las limitaciones del mismo instrumento, y sin compensación por diferencias de temperatura. Así, el refractómetro digital representa una alternativa precisa, rápida y relativamente accesible para la monitorización del sustrato durante la fermentación, con la mayor precisión necesaria para la estandarización tanto del proceso como del producto.

En la producción de tequila el jugo de maguey cocido dispuesto a fermentar se ajusta, según Cedeño (2003) y Lappe *et al.* (2008), a entre 10 y 14 % de AF, los cuales disminuyen al término de la fermentación hasta 0.50 % (AF residuales); esto corresponde a una utilización de los AF de 95.83 %. La utilización registrada de los AF al final de la fermentación en ambas épocas fue inferior a la de tequila; 73.14 % en la época lluviosa y 75.86 % en la época fría (Cuadro 3.4). De los AF residuales el 70 % correspondió a glucosa en la época lluviosa y 71 % en la fría (Cuadro 3.4). La utilización de fructosa fue cerca de 90 % en ambas épocas; en cambio, la utilización de glucosa fue de 30.84 % en la época lluviosa y 44.42 % en la época fría. En el mismo cuadro (Cuadro 3.4) se puede observar que en la época fría se registró también el mayor porcentaje de utilización del sustrato total, probablemente por la aportación de nitrógeno que se hizo en dicha época, lo cual aparentemente eliminó los efectos del estrés térmico que el fermento posiblemente sufrió en su etapa de reactivación y reproducción.

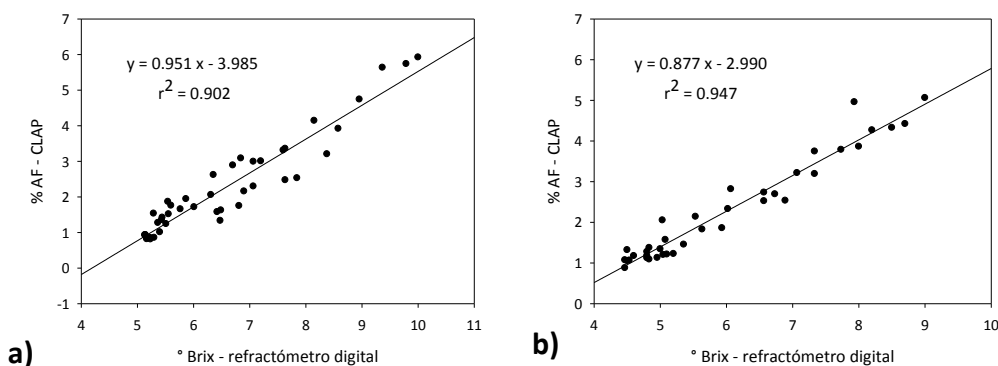


Fig. 3. 19 Regresión de °Brix medidos con refractómetro digital sobre las cuantificaciones de AF por CLAP; a) época lluviosa; b) época fría.

En términos absolutos, en la época lluviosa se registraron 81.31 kg de AF residuales sin fermentar, correspondientes a 23.17 kg de fructosa (28.49 %) y 58.14 kg de glucosa (71.50 %); esto representa cerca del 27 % del sustrato inicial dispuesto a fermentación. En cambio, en la época fría, cuando se añadió nitrógeno, la fermentación fue más eficiente pues sólo se registraron 69.79 kg de AF residuales, de los cuales 19.6 kg (28.08 %) de fructosa y 50 kg de glucosa (50.19 %), esto es, cerca del 23 % del total de AF iniciales.

El porcentaje tan alto de AF residuales en comparación con los mencionados para la producción de tequila (0.5 %), se puede atribuir a condiciones de estrés a las que se enfrenta las poblaciones de levaduras. Entre ellas, podrían señalarse al estrés osmótico causando por altas concentraciones del sustrato en el crecimiento y reproducción de las levaduras, y durante la fermentación su posible alta sensibilidad al etanol, el cual incrementa su concentración conforme transcurre el tiempo y se agotan los AF, y termina por ser tóxico por las propias levaduras que lo generaron; en segundo término acumulación de CO₂, ácidos orgánicos y otros productos metabólicos generados por la fermentación; el estrés térmico durante la época fría y la carencia e insuficiencia de nitrógeno; la posible mayor riqueza de saponinas del maguey mezcalero que el tequilero, lo cual de manera conjunta afecta significativamente la vitalidad y viabilidad de la levadura. Sin embargo, *S. cerevisiae* es una especie increíblemente resistente a diversas condiciones de estrés, aunque con menoscabo de su eficiencia, por lo que es importante reconocer y favorecer sus condiciones óptimas (Russell, 2003).

Densidad microbiana. La densidad microbiana en los jugos de la pila al inicio de la fermentación alcanzó un valor promedio en ambas épocas de 6.93, equivalente a 8.5×10^6 levaduras/ml. La diferencia entre dicho valor y la densidad aparente del fermento de la pileta (5.3×10^6 levaduras/ml), es la cantidad de levaduras contenida en los jugos frescos esto es 3.2×10^6 levaduras/ml, probablemente proceden del ambiente natural de la materia prima y también de incorporarse estas levadura al jugo de la molienda desde la pileta del molino, la pila de lavado del bagazo y de fermentación, y de canales. La densidad de levaduras (8.5×10^6 levaduras/ml) con la cual se inicia la fermentación

alcohólica para la elaboración de mezcal potosino, es dos veces menor que la registrada para tequila ($20-30 \times 10^6$ levaduras/ml) (Cedeño, 2003).

En la época lluviosa la población de levaduras tendió a decrecer desde el inicio de la fermentación, en parte por la disminución de sustrato, pero probablemente en mayor medida por la carencia de nitrógeno. En cambio, en la época fría, cuando sí se añadió nitrógeno, la población microbiana se mantuvo relativamente estable hasta el final de la fermentación, a pesar del estrés térmico prevaleciente (Figura 3.20). Como el recuento en cámara de la Neubauer sólo es un método cuantitativo de densidad microbiana (levaduras), faltaría una caracterización cualitativa en las tres épocas o estaciones funcionales, pues sólo se cuenta con la caracterización de dos lotes sin referencia de época, realizada por Verdugo *et al.* (2011), quienes identificaron con técnicas moleculares de secuenciación de ADN, a *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Torulaspota delbrueckii*, en orden decreciente de importancia, y encontraron que *S. cerevisiae* terminó por ser la especie dominante y la responsable de concluir la fermentación alcohólica, como sucede en diversas fermentaciones alcohólicas (Fleet *et al.*, 1984; Granchi *et al.*, 2003).

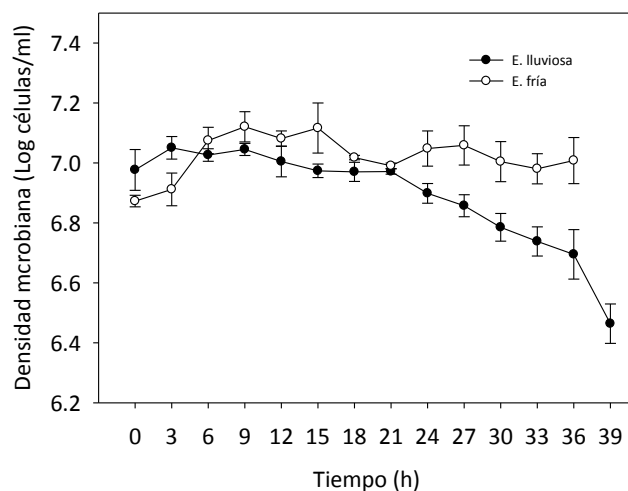


Fig. 3. 20 Densidad microbiana en escala logarítmica durante la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

Cuadro 3.4 Composición relativa y absoluta de AF al inicio y al término de la fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido, en dos épocas funcionales del año.

Parámetro	É. Seca			Época lluviosa			Época fría		
	L-1	L-2	L-3	media	L-4	L-5	L-6	media	
AF iniciales (%)	3.72	4.13	5.89	3.12	4.38	4.41	5.05	3.35	4.27
AF residuales (%)	1.07	1.08	1.62	0.84	1.18	1.06	1.13	0.87	1.02
Consumo de AF (%)	71.23	73.84	72.50	73.08	73.14	75.96	77.62	74.00	75.86
Fructosa inicial (%)	2.52	2.76	4.49	2.13	3.13	3.10	3.42	2.29	2.94
Fructosa residual (%)	0.18	0.14	0.70	0.21	0.35	0.26	0.33	0.27	0.29
Consumo de fructosa (%)	92.85	94.93	84.41	90.14	89.83	91.61	90.35	88.21	90.06
Glucosa inicial (%)	1.20	1.37	1.40	0.99	1.25	1.31	1.63	1.06	1.33
Glucosa residual (%)	0.89	0.94	0.92	0.63	0.83	0.80	0.80	0.60	0.73
Consumo de glucosa (%)	25.83	21.89	34.29	36.36	30.84	38.93	50.92	43.40	44.42
AF inicio (kg)	-	319.99	371.46	215.88	302.44	300.59	359.81	217.96	292.79
AF residuales (kg)	-	83.67	102.17	58.12	81.31	72.25	80.51	56.60	69.79
Fructosa inicial (kg)	-	213.84	283.16	147.38	214.79	211.3	243.68	148.99	201.32
Fructosa residual (kg)	-	10.84	44.15	14.53	23.17	17.72	23.51	17.57	19.60
Glucosa inicial (kg)	-	106.14	88.29	68.50	87.64	89.29	116.14	68.97	91.47
Glucosa residual (kg)	-	72.83	58.02	43.59	58.14	54.53	57.00	39.04	50.19

Etanol. El rendimiento de etanol se calculó con base en el resultado teórico de la reacción de fermentación: 1 g de glucosa genera 0.51 g de etanol al 100 %, 0.49 g de dióxido de carbono. A la vez, a partir del volumen de mezcal producido (41° GL) por cada lote de fermentación estudiado, en las dos épocas funcionales, se estimó el rendimiento de etanol de dichas fermentaciones.

Como se observa en el Cuadro 3.5 el volumen de mezcal destilado en cada época fue estadísticamente similar. En cambio el rendimiento por unidad de sustrato sí fue diferente ($p < 0.05$). Así, el rendimiento medio aparente de etanol por unidad de AF consumido fue mayor (0.46) para la época lluviosa que para la fría (0.32), lo cual correspondió a eficiencias aparentes de 89.86 y 63.09 % respectivamente. Sin embargo, en estos cálculos están excluidos los AF residuales sin fermentar, esto es en promedio cerca del **25 %** de la concentración inicial expuesta a fermentación. El rendimiento neto por unidad inicial de AF fue diferente entre épocas ($p < 0.05$), y también mayor (0.33) para la época lluviosa que para la época fría (0.25), con eficiencias netas correspondientes de **65.79 y 48.05 %**, respectivamente. Esta es la eficiencia real de la fermentación alcohólica, la cual en principio es relativamente pobre debido a las concentraciones bajas de AF al inicio de la fermentación, y a porcentajes altos de AF residuales al final de la fermentación, pues como Cedeño (2003) señala para la productividad de tequila, cuanto menor sea la concentración del sustrato ajusto y mayor la de AF residuales, se tiende a tener mayores costos de producción.

Sin embargo se tendrían que hacer pruebas sobre concentraciones mayores del sustrato que las usadas actualmente en la fábrica, pues hay que considerar la características de la materia prima local (menor contenido de azúcares y mayor de saponinas que el maguey tequilero) y sus interacciones con la levadura para la conversión de etanol.

Cuadro 3.5 Rendimiento absoluto y relativo de etanol estimado por lote procesado con base en el volumen de mezcal destilado en la fábrica Laguna Seca en dos épocas funcionales del año.

Parámetro	Época lluviosa				Época fría				Probabilidad
	L-1	L-2	L-3	media	L-4	L-5	L-6	media	
Volumen de la pila de fermentación (L)	7450.00	6064.00	6653.00	6772.33	6454.00	6851.00	6256.00	6520.30	0.5409
AF al inicio (kg)	308.40	371.50	215.90	298.59	300.60	359.80	218.00	292.79	0.7775
AF consumidos (kg)	228.00	269.30	157.80	218.34	228.30	279.30	161.40	223.00	0.8881
Mezcal de 41 ° GL (L)	280.00	265.00	180.00	241.70	175.00	200.00	150.00	175.00	0.1240
Proporción de etanol en el vino (% v/v)	1.541	1.79	1.11	1.48	1.11	1.20	0.98	1.10	0.1719
Etanol 100 % (L)	114.80	108.70	73.80	99.08	71.75	82.00	61.50	71.75	0.1240
Rendimiento aparente de etanol (g etanol/g de AF consumido)	0.50	0.40	0.47	0.46	0.31	0.29	0.38	0.32	0.0354 *
Eficiencia aparente (%)	98.74	79.11	91.73	89.86	61.61	57.57	74.73	63.09	0.0354 *
Rendimiento neto de etanol (g etanol/g de AF totales)	0.37	0.29	0.34	0.33	0.24	0.23	0.28	0.25	0.0320 *
Eficiencia neta (%)	72.98	57.35	67.03	65.79	46.8	44.69	55.33	48.05	0.0320 *
Rendimiento aparente de mezcal (L de 41° GL/kg AF consumidos)	1.22	1.40	1.20	1.27	1.72	1.80	1.45	1.67	0.0365 *
Rendimiento neto de mezcal (L de 41° GL/kg AF consumidos)	0.91	1.02	0.88	0.93	1.30	1.40	1.08	1.27	0.0349 *

* p < 0.05

Además de los AF residuales al final de la fermentación, la ineficiencia en ambas épocas, puede ser debida a otros factores, como, el control deficiente de la temperatura, la ausencia o insuficiencia de nitrógeno, la calidad de la materia prima y las condiciones de reactivación y reproducción de la levadura (preparación del fermento) principalmente. Por otro lado, algunos inhibidores de la fermentación (saponinas y compuestos metabólicos propios y ajenos a las poblaciones de levaduras) también pueden estar influyendo en la represión de las poblaciones productoras de etanol.

3.4 Conclusiones

La fábrica de mezcal Laguna Seca trabaja actualmente a una quinta parte de su capacidad instalada.

La fermentación alcohólica de jugos de maguey cocido en la fábrica de mezcal Laguna Seca se realiza sin bagazo y es inducida con un caldo de fermento nativo reciclado y propagado previamente.

La concentración de AF del jugo fresco de la molienda usado en la reactivación y propagación del caldo de fermento es mayor en la época fría (12.24 %) que la lluviosa (7.84 %), pues en esta última el maguey presenta mayor succulencia, que se traduce en una dilución de los compuestos sintetizados por la planta.

Como se utiliza jugo fresco para la reactivación y propagación del caldo de fermento, la concentración de AF es indebidamente más alta (53 % en promedio) que la concentración óptima (6.5 %) usada en la producción de tequila.

Se carece de regulación en la concentración inicial de la fuente de nitrógeno para la reactivación y multiplicación del caldo de fermento.

Se carece de control de la temperatura en la reactivación y propagación del caldo fermento, lo cual limita el crecimiento y reproducción de la levadura durante la época fría, y reduce el rendimiento de etanol por unidad de AF puestos a fermentación.

Las condiciones adversas en ambas épocas estudiadas (carencia de nitrógeno en la lluviosa y estrés térmico en la fría), impidieron reconocer objetivamente otros efectos en inhibición del desarrollo de la levadura debidos a la concentración elevada del sustrato.

La densidad microbiana del caldo de fermento parece suficiente (8.5×10^6 levaduras/ml) para iniciar la fermentación, aunque muy baja en comparación con la usada en la producción de tequila ($20-30 \times 10^6$ levaduras/ml). Además, las condiciones de estrés pueden afectar su vitalidad y viabilidad durante la fermentación.

La época funcional influyó significativamente en el pH y contenido de AF de los jugos frescos, y en la temperatura de la cámara o nave de fermentación.

Existe variación en la concentración de AF al inicio de la fermentación, la cual puede ser significativa para la estandarización tanto del proceso como del producto; esta variación es debida a imprecisión del instrumento usado (sacarímetro tipo densímetro).

El uso de fosfato diamónico (grado alimentario) como fuente de nitrógeno, favorece fermentaciones deseables y relativamente rápidas (< 40 h), en comparación con las fermentaciones tradicionales (espontáneas) de otras regiones mezcaleras con duración de hasta 7 días.

La agregación de nitrógeno (fosfato diamónico) al inicio de la fermentación es irregular y probablemente insuficiente, pues la concentración conseguida se encuentra por debajo de los 0.5 g/L recomendados para un sustrato con 4 % de AF.

El calentamiento de los jugos al inicio de la fermentación evita el estrés térmico durante la época fría, aunque, se no se controla durante la reactivación y propagación del fermento, por lo cual se sugiere el rediseño del calentamiento con circulación de vapor a través de tubos situados en el fondo de las piletas.

El porcentaje de consumo promedio de AF al final de la fermentación es de 74.5 % del sustrato inicial, inferior al registrado para tequila de 92.5 %; el mayor consumo de AF por la población microbiana ocurrió entre las 3 y las 18 h de fermentación.

Las poblaciones microbianas consumieron más fructosa que glucosa, por lo que esta última presentó mayor proporción al final de la fermentación.

La utilización de la fructosa fue cerca de 90 % y la de la glucosa del 37 %, por lo que esta última molécula conformó cerca del 70 % de los AF residuales.

La relación de los °Brix medidos con refractómetro digital y la cuantificación de AF por CLAP presentan una correlación positiva y altamente significativa, lo cual respalda la conveniencia de utilizar un refractómetro digital (Apéndice II) como instrumento de medición más confiable para ajustar la concentración de AF en los jugos frescos, con base en la ecuación de regresión correspondiente.

El menor rendimiento medio mezcal se registró en la época fría, 1.67 kg de AF por litro de 41° GL, probablemente por las temperaturas más adecuadas en la reactivación y propagación del fermento, así como en la fermentación.

En general las condiciones de la reactivación y propagación del caldo de fermento son diferentes a las de la fermentación alcohólica, probablemente afectando el rendimiento y eficiencia de la fermentación, por las condiciones de estrés en la que se desarrolla el fermento. Para resolver esto, es necesario llevar a cabo el ajuste inmediato necesario de las condiciones del microambiente de la reactivación y propagación del fermento en función del microambiente de la fermentación alcohólica

3.5 Bibliografía

- Aguirre R., J. R.; H. Charcas S.; J. L. Flores F. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, SLP. México. 78 p.
- Aguirre R., J. R. 2009. Mezcal potosino, un tesoro escondido. Por Amor al Arte. San Luis Potosí, SLP. México. 50: 8-9.
- Anónimo. 2009. Miércoles turístico, SMCTSM. Real de Catorce. Pueblo lleno de historias, leyendas y tradiciones. En: XXIX Annual Meeting, International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum 2009. 21 al 25 de septiembre San Luis Potosí. [consulta realizada 12 diciembre 2011]. Disponible en: <http://www.smcsyv.org.mx/congresoXXIX/programa/conference_tour.php>.

- Anónimo. 2010. Cámara Thoma y Neubauer Improved para el recuento de levaduras (*tiraje*). GAB Sistemática Analítica S.L. [consultado 8 enero 2010]. Disponible en: <http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20thoma%20neubauer_Esp.pdf>.
- Arellano, M.; C. Pelayo; J. Remírez; I. Rodríguez. 2008. Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 835-841.
- Arrizon G., J. P. 2000. Efecto de la concentración de azúcar y la adición de nitrógeno sobre el proceso de fermentación del tequila. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 172 p.
- Arrizon, J.; C. Fiore; G. Acosta; P. Romano; A. A. Gschaedler. 2006. Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeast in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. (89):181-189.
- Arrizon J.; A. Gschaedler. 2007. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*. 102: 1123-1131.
- Bazant, J. 1980. Cinco haciendas mexicanas. Tres siglos de vida rural en San Luis Potosí. (1600-1910). El Colegio de México. México. 229 p.
- Berthels, N. J.; R. R. Cordero O.; F. F. Bauer; J.M. Thevelein; I.S. Pretorius. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Federation of European Microbiological Societies. Yeast Research*. 4: 683-689.
- Blanco P.; M. Vázquez A.; A Losada. 2008. Influence of yeast population on characteristics of the wine obtained in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinífera* Lado. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35:183-188
- Cedeño C., M. 2003. Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes. In: K. Jacques; T. P. Lyons; D. R. Kelsall (Eds.). *The alcohol textbook*. 4th ed. Nottingham University Press. England. pp. 223-245.
- Covarrubias C., M.; S. Capella V. 2007. Correlación de compuestos volátiles del tequila con su origen. *Bebidas Mexicanas*. (diciembre 2006 - enero 2007): 10-17.

- De León R., A.; L. González H.; A. P. Barba D. R.; P. Escalante M.; M. G. López. 2006. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 54: 1337-1341.
- Fleet G., H.; S. Lafon L.; P. Riéreau G. 1984. Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (5):1034-1038
- Fleet G., H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 11-22.
- Granchi L., D. Ganucci; C. Viti; L. Giovannetti, M. Vincenzini M. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Letters in Applied Microbiology*. 36:54-58.
- Gschaedler, A., 2007. La industria del mezcal en el altiplano potosino: tradiciones y retos tecnológicos. *IPICYT. ciencia@sanluispotosi.mx*. 30: 5.
- Holm H., E.; P. Nissen; P. Sommer; J. C. Nielsen; N. Arneborg. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentation of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 541-547.
- Jiménez M., E.; M. lí del O. 2008. Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *Federation of European Microbiological Societies*. 8: 245-256.
- Lappe O., P.; R. Moreno T.; J. Arrizon G.; T. Herrera S.; A. García M.; A. Gschaedler M. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *Federation of European Microbiological Societies* 8:1037-1052.
- Leveau J., Y.; M. Bouix.; tr. F. J. Carballo G. 2000. *Microbiología industrial: Los organismos de interés industrial*. Acribia. Zaragoza. España. 595 p.
- Littell, R. C.; P. R. Henry; C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using the SAS procedures. *Journal Animal Science*. 76: 1216–1231.
- Matthew C., C.; F. Russell; D. E. Block. 2007. Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 23 (18): 5875-5884.
- Mendes F., A.; A. Mendes F.; C. Leao. 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 540-545.

- Michel C., C.; B. I. Juárez F.; J. R. Aguirre R.; J. M. Pinos R. 2008. Quantitative characterization of non-structural carbohydrates of mezcal agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 56: 5753-5760.
- Núñez V., M. L.; M. Arellano P. 2000. Informe final de la asistencia técnica realizada a la empresa "Cia. Vinícola Alfa, S.A. de C.V." CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. México. 24 p.
- Payno, M. 1864. Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos. A. Boix. México. 132 p.
- Russell. 2003. Understanding yeast fundamentals. In: K. A. Jacques.; T. P. Lyons; D. R. Kelsall. The alcohol textbook. 4th ed. Nottingham University Press. England. pp. 85-119.
- Tello B., J. J.; E. García, M. 1985. The mezcal industry in the altiplano Potosino-Zacatecano of North-Central México. *Desert Plants*. 7(2): 81-87.
- Varela, R. (2012, febrero 20). Repunta consumo de mezcal. Aunque todavía muy lejos del desplazamiento que ha logrado el tequila, el consumo de mezcal creció en el último año. *El financiero*. p. 20.
- Verdugo V., A.; I. Segura G.; M. Kirchmayr; P. Ramírez R.; A. González R.; A. González E.; R. Coría. A. Gschaedler M. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-011-9605-y. 10 p.
- Walker, M. G. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Wiley. Chichester, England. 350 p.
- Zamora P., C.; B. I. Juárez F.; J. R. Aguirre R.; D. Ortiz P.; C. I. Godínez H.; G. Álvarez F. 2010. Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero potosino. *e-Gnosis* 8 (7): 1-11.
- Zamora P., C. 2012. Diagnóstico del proceso actual de elaboración de mezcal en la empresa "Laguna Seca" y alternativas para mejorar su eficiencia. Tesis doctoral. Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San. Luis. Potosí, SLP. México. 81 p.

Apéndice I

Técnicas analíticas

A- 1 Contenido de glucosa y fructosa estimado por cromatografía líquida de alta presión (CLAP)

De acuerdo con Michel *et al.* (2008), los jugos hidrolizados de cabezas de *A. salmiana* contienen casi solamente fructosa y glucosa; por ello solamente se cuantificaron estos dos azúcares reductores. Para ello, se utilizó un cromatógrafo Agilent HP serie 1100 - Alemania (Figura A 1.1); como fase estacionaria una columna no polar Zorbax C₈, específica para carbohidratos (4.6 mm i.d. x 250 mm x 5 µm de tamaño de partícula), en fase reversa y como fase móvil polar acetonitrilo: agua 75:25 (v/v). Los azúcares presentes fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención, con los correspondientes a los estándares de referencia (Sigma, St. Louis Mo) (Michel *et al.*, 2008). La cuantificación de los azúcares se realizó por el método del estándar externo, el cual permite calcular la concentración tomando como base el área bajo la curva del cromatograma correspondiente a cada carbohidrato, y su comparación con la generada para los estándares, cuya concentración es conocida. Se construyó una curva de calibración lineal de 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 % de glucosa y fructosa. Las muestras fueron pasadas a través de filtros de nylon de 0.45 µm de diámetro y aforadas a 1 ml con una solución de 50:50 acetronitrilo:agua (Michel *et al.*, 2008).



Fig. A 1.1 Equipo de cromatografía líquida de alta presión usado para la cuantificación de azúcares fermentables.

A- 2 Recuento de levaduras en cámara de Neubauer

Se eligió este método y no el espectrofotométrico debido a que las muestras contienen partículas finas de tierra que pueden interferir. Las muestras se centrifugaron a 4500 rpm, el sedimento se resuspendió en un volumen igual al inicial con agua y se homogenizó con ayuda de un vortex (Thermolyne Maxy Mix II 37600). Luego, se tomó un cubreobjetos y se colocó encima de los retículos de la cámara; con la ayuda de una micropipeta y una punta nueva, se tomaron 20 μl de la muestra y se colocaron entre la cámara y cubreobjetos con el fin de llenar el cuadro central con la muestra por capilaridad. Después de esto, se procedió a colocar la cámara en la platina del microscopio (American Optical Corporation), se contaron las levaduras utilizando un aumento de 45x (Figura A 1.2).

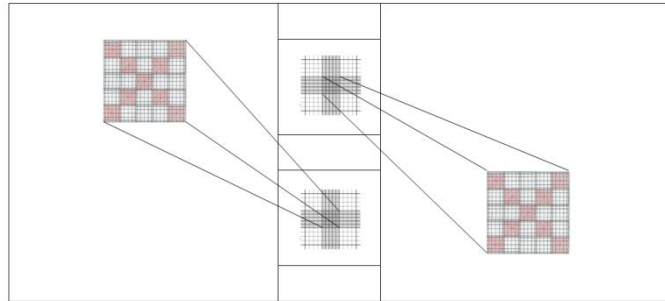


Fig. A 1.2 Esquema del recuento en cámara de Neubauer.

A- 3 Contenido de nitrógeno (amonio) por espectrofotometría

El contenido de nitrógeno amoniacal se realizó con el método colorimétrico del fenato (para lo cual se prepararon dos soluciones; la primera (coloreado de fenol), se preparó disolviendo 25 g de fenol en 400 ml de agua destilada; por separado 125 mg de nitroferriicianuro de sodio en 50 ml de agua, y se añadieron a la solución de fenol, y por último se aforó a 500 ml. La segunda solución (hipoclorito alcalino) se preparó disolviendo 12.5 g de NaOH en 400 ml de agua, después se le añadieron 20 ml de cloro comercial y se aforó a 500 ml (Arrizon, 2000).

Para la cuantificación de amonio se tomaron 20 μl de la muestra previamente centrifugada, y se le agregó 1 ml de la solución coloreada de fenol, se agitó lentamente, y se le agregó 1 ml de hipoclorito alcalino, se volvió a agitar de la misma manera (Arrizon,

2000). Se dejó reposar 30 min en un baño maría (marca: J. M. Ortiz) a 37 ° C, al final se agregaron 5 ml de agua, se agitó y se leyó a 630 nm en un espectrofotómetro (Agilent HP 8453 UV-visible, Alemania) (Figura A- 3.7), la absorbencia se comparó con una curva patrón que va de 10 a 50 mg/ml de fosfato de amonio (Jalmek, NL, México) (Arrizon, 2000).



A 1.3 Equipo de espectrofotometría que se usó para la cuantificación de nitrógeno amoniacal.

A- 4 Cuantificación de compuestos volátiles

La cuantificación de los compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios (etanol y metanol), se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent HP 5890, Alemania (Figura A 1.4) por el método del estándar interno, de acuerdo a la técnica empleada por De León (2006). La preparación de la muestra para inyección, se realizó agregando 8 ml de agua en un matraz volumétrico de 10 ml, con 100 μ l de la muestra ya centrifugada y filtrada y 25 μ l de estándar interno y se ajustó con agua a 10 ml. Las muestras se analizaron por inyección de 1 μ l en un CG con un columna capilar (HP-Innowax, 30m x 0.25 m i.d., 0.25 μ m, Agilent Technologies). Como gas acarreador se usó helio a un flujo de 1.5 ml/min, las temperaturas del inyector y detector de ionización de flama fueron de 220 y 250°C, respectivamente. Las condiciones cromatográficas fueron: modo de inyección "Split" de 10:1, con una temperatura programada de 35 °C /2 min, incrementándose 10 °C/min hasta 210°C, con la cual se mantuvo hasta el final por 20.5

min. Se utilizó una curva una curva estándar de 0.04 % a 0.005 % de etanol (99.99 % de pureza).



Fig. A 1.4 Equipo de cromatografía de gases que se usó para la cuantificación de compuestos volátiles.

Apéndice II

Refractómetro digital AR200



Reichert AR200 Digital Refractómetro de mano NUEVO zafiro resistente!

El **AR200** es también el refractómetro portátil más versátil del mercado y se puede programar con cualquier escala necesaria, incluidas las disponibles en unidades de la competencia.

El AR200 de Reichert es el refractómetro portátil más avanzado que mide digitalmente el ángulo crítico, el índice de refracción de luz reflejada ó el porcentaje % de sólidos (brix) comprendido en todo el intervalo de 0 -95 % Brix y el índice de refracción entre 1.3300 – 1.5600 nd.

El AR200 permite alcanzar una precisión rigurosa de +/-0.0001nd ó 0.1 % Brix, comparable a los instrumentos de mesa de laboratorio.

Totalmente automático y fácil de usar permite eliminar problemas de interpretación por parte de los usuarios.

Existe un paquete opcional de enlace para establecer conexión a PC que permite sacar el máximo partido de las funciones adicionales del software tales como la recuperación de datos almacenados y la programación de hasta tres canales definibles por el usuario,

calibraciones multipunto de hasta 5 puntos (disponibles aceites estándar certificados nist para su calibración).

Calibraciones simples con agua o multipuntos, 4 modos de lectura y el ajuste de contraste. Totalmente hermético resistente a agentes químicos y protección medioambientales máximas.

Especificaciones técnicas:	
Número de catálogo	13950000
Modelo	AR200
Rango de lectura	1,33 a 1,56 el índice de refracción de escala completa de grados Brix por ICUMSA
Balanza	Escala completa de grados Brix por Icumsa índice de refracción escalas, grados Brix, hasta 3 definible por el usuario
Precisión	0,00001 índice de refracción de 0,1 grados Brix
Calibración	Set Point o Punto de Ajuste / span definible por el usuario
Ensamble del prisma	Sapphire en acero inoxidable Bueno
Interfaz de usuario	Simple, eficaz y de 3 botones de operación
E / S	IR Docking Station a través de RS-232-C de puerto serie
Garantía	2 Años
Poder	4 - Baterías alcalinas AAA incluido
Duración de la batería	3000 Lecturas + con modo de espera de apagado automático
Dimensiones	7 "x 3.75" W x 1.37 "H (18x9x3.5 cm)
Accesorios	13951000 - IR Paquete de Comunicaciones (Docking Station y Software)
Otras Características	Registro de la lectura electrónica de los últimos 225 Lecturas características y el registro de calibración actual

URL: <http://www.spectraservices.com/REIAR200.html>