



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE
MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INGENIERÍA QUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**“OPTIMIZACIÓN EN LA ETAPA DE FERMENTACIÓN DE LA ELABORACIÓN DE
MEZCAL EMPLEANDO COMO CATALIZADOR LA SEMILLA DE GUAYABA”**

Desarrollado por:

JESSICA ALEJANDRA YAÑEZ MARTINEZ

No. De control:

14270346

Asesor interno:

M.C. ROBERTO VASQUEZ SOLIS

Asesor externo:

IQ.A. ALEJANDRA IRAIS RAYMUNDO ORTIZ

Revisores:

ING. MIGUEL CID DEL PRADO

ING. JOSÉ LUIS ESCOBAR VILLAGRAN

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 24 de Enero del 2019.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, por los conocimientos que me fueron otorgados durante el tiempo que duro la carrera.

A los docentes del ITTG que compartieron los conocimientos correctos durante la carrera.

A mis padres, María Martínez López y Raquel Yáñez Martínez por el amor, cariño y apoyo incondicional que me brindan y la educación moral que me enseñaron durante toda mi vida.

A mis hermanos y hermanas por apoyarme durante toda mi etapa de estudiante.

A Dios que me permite terminar una meta en mi vida, por la salud y la sabiduría incomparable

A Sabores Intensos, Koch por permitirme realizar la residencia profesional en su empresa.

A las personas que se cruzan en mi camino y que dejan una huella, aprendizaje y memorias imborrables.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN.....	1
Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Descripción de la Empresa.....	6
Planteamiento del Problema.....	7
Objetivos.....	9
Justificación.....	10
Marco Teórico	
Capitulo 1. Levaduras y su Ecología en las Bebidas Alcohólicas.....	11
1.1. Metabolismo de la Fermentación.....	12
1.2. Fases de Crecimiento.....	14
1.3. Condiciones de Fermentación.....	15
1.4. Productos Secundarios de la Fermentación.....	17
1.5. Fundamento de Elaboración del Sustrato.....	18
Capitulo 2. Generalidades del Agave	
2.1. Descripción del Agave.....	20
2.2. Cultivo del Agave.....	21
2.3. Morfología del Agave.....	23
2.4. Enfermedades del Agave.....	24
2.5. Maguey Espadín (Agave Angustifolia Haw)	25
Capítulo 3. Bebidas Alcohólicas	
3.1. Definición de Bebidas Alcohólicas.....	27
3.2. Clasificación de las Bebidas Alcohólicas.....	27
3.3. Definición del Mezcal.....	28
3.4. Clasificación del Mezcal.....	29
Capitulo 4. Proceso de Elaboración del Mezcal	
4.1. Mezcal.....	30
4.2. Características Físicoquímicas del Mezcal.....	30

4.3. Cocción.....	31
4.4. Molienda.....	32
4.5. Fermentación.....	34
4.6. Destilación.....	35
4.7. Rectificación.....	38
Capitulo 5. Fermentación	
5.1. Definición de Fermentación.....	40
5.2. Fermentación alcohólica.....	43
5.3. Psidium Guajava L. (Guayaba Manzana)	45
Capitulo 6. Metodología	
6.1. Materiales y Reactivos.....	47
6.2. Diagrama de Flujo.....	48
6.3. Método para Extraer las semillas de guayaba.....	49
Procesamiento de Resultados.....	52
Análisis de Resultados.....	56
Conclusión.....	58
Anexos.....	59
Referencias Bibliograficas.....	68

RESUMEN

La fermentación puede ser llevada a cabo de manera natural por microorganismo autóctonos, entre las cepas más comúnmente encontradas en las bebidas tradicionales se encuentran las cepas de *S. cerevisiae* por su alta producción etanólica, sin embargo las cepas no-*Saccharomyces* crecen bien en las etapas iniciales y proporcionan características especiales a las bebidas de las cuales hay poca información y por lo tanto se desconoce el potencial biotecnológico y la capacidad fermentativa individual de cada una de las cepas de levadura involucradas.

En este trabajo de investigación se analizó la capacidad fermentativa que tiene la semilla de guayaba en medios de cultivo de PDA en Agar Biggy bajo condiciones controladas como la temperatura y el crecimiento de las colonias de levaduras presentes en las cajas Petri. Al igual se implementó la semilla de guayaba en prueba piloto en la realización de la fermentación de mosto con agave *Angustifolia* controlando las variables de temperatura, formación de azúcares y la obtención total de alcohol en la tina.

INTRODUCCION

Las bebidas fermentadas regionales han estado presentes desde hace mucho tiempo y han sido producidas a través de fermentaciones espontaneas. La preparación de muchos alimentos y bebidas fermentadas tradicionales se realiza en el entorno doméstico a expensas de las condiciones existentes en el lugar, ha evolucionado hasta convertirse en un bioproceso que se lleva a cabo a escala comercial en condiciones controladas. La fermentación puede llevarse a cabo de manera natural o inducida, en la primera el microbiota nativo presente en el medio inicia y termina la fermentación, y en la segunda, se inocula el medio con cepas seleccionadas comerciales. (Doyle et al., 1997).

Las fermentaciones espontaneas se llevan a cabo a partir de diversos sustratos, y estos sustratos representan un hábitat de gran importancia para el estudio de la dinámica de las poblaciones de levaduras nativas (López-Arboleda et., 2010). Las cepas de levadura más comúnmente encontradas en los procesos fermentativos pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*; las levaduras no-*Saccharomyces* crecen bien en las etapas iniciales de la fermentación y aportan características especiales a la bebida; pero son subsecuentemente reemplazadas durante las etapas siguientes por cepas del género *Saccharomyces*, las cuales con más tolerantes al etanol (Verdugo, 2007).

A pesar de que se han realizado muchos estudios de las bebidas tradicionales fermentadas en parte del mundo, aún falta información sobre los cambios microbiológicos, bioquímicos y nutricionales durante la etapa de fermentación. En el estado de Oaxaca se produce el mezcal, bebida artesanal derivada de diversas especies de agave, de los cuales se obtiene un aroma y sabor único que caracteriza a la bebida. En el presente trabajo, se analizó en condiciones controladas de laboratorio, la capacidad fermentativa de las cepas de levadura que están presentes en el maguey *Angustifolia*, para detectar el tiempo optimo en que fermenta con la semilla de guayaba, manteniendo una temperatura constante y observando el tiempo de fermentación, sin olvidar que se pretende no afectar las propiedades organolépticas del mezcal.

DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

SABORES INTENSOS, S. DE R.L. DE C.V. MARCA COMERCIAL “KOCH, EL MEZCAL”

Sabores Intensos, S. de R.L. de C.V., empresa joven oaxaqueña que tiene como visión llegar a ser una empresa de impacto nacional e internacional dentro de la industria mezcalera, reconocida por su calidad y su excelencia en su servicio.

Misión ser una comercializadora de mezcales y destilados de agave de calidad a precios justos, con un trato personal y humano para satisfacer las necesidades de los clientes, proveedores y el medio ambiente, siendo una empresa sustentable y factible.

A pesar de que esta bebida tiene una gran importancia económica para los estados donde se produce, tiene un gran sentido cultural y tradicional el producir mezcal, ya que diversos maestros mezcaleros le añaden un sabor característico dependiendo de la zona en donde se produzca el mezcal, es decir, le ponen la esencia que caracteriza a un buen mezcal.

ORGANIZACIÓN

La empresa cuenta con un director general, y con un total de 100 empleados, esta a su vez tiene áreas definidas, en los cuales desempeñan las actividades indicadas, tiene 5 áreas: Contabilidad, Área de líquidos, Envasado, Etiquetado, Logística.

El área en el que trabajamos fue el Área de líquidos, en esta área laboran 8 personas encargadas de entregar el líquido correspondiente y en las condiciones adecuadas para que sea envasado. En esta área trabajan con las condiciones adecuadas a las normas: NOM-070-SCFI-2016 y la NOM-142- SSA1/SCFI-2014, para entregar un producto de calidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a investigaciones realizadas, se tiene conocimiento que la etapa de fermentación para la formulación del alcohol se toma un tiempo aproximadamente de 20 días en obtener un mosto adecuado para la destilación. En la localidad de Santiago Matatlán, ubicada en los Valles Centrales del estado de Oaxaca cuenta con una población de 3,443 habitantes. “Matatlán es la capital del mezcal, la mayoría de las personas se dedican a fabricar mezcal y a la siembra del maguey”. En total hay 76 fábricas certificadas ante el Consejo Mexicano Regulador del Mezcal, las cuales están certificadas y cumplen con la NOM-070-SCFI-2016.

MACROLOCALIZACIÓN



Figura 1. Localización de la zona

MICROLOCALIZACION



Dirección: Agua Blanca #1 Paraje Guiientzarenii, Santiago Matatlán, Oaxaca

En esta localidad se tiene registros que la etapa de fermentación tarda 20 días en obtener los azúcares presentes en el mosto, por lo cual se tomaron muestras del maguey cocido de la especie agave angustifolia, para la realización de las pruebas de laboratorio, el agave proporcionado fue por el señor Méndez.

En base a la información y conocimiento de los maestros mezcaleros de la zona, en tiempo de lluvias la fermentación de las tinas llega a tardar hasta 25 días lo que ocasiona que la producción del mezcal sea algo lenta, y tengan pérdidas en base a costos en materia prima, por la compra de leña y la doble destilación que realizan en algunos palenques de la región. En temporadas de sequías, la etapa de fermentación es óptima ya que la temperatura ambiente es ideal para la fermentación y por la temperatura idónea de los microorganismos presentes en el agave.

Se pretende acortar el tiempo de residencia que tiene una tina de fermentación haciendo que esta etapa dure aproximadamente 7 días en total, se reduzcan costos y sea óptimo para la siguiente etapa que es la de la destilación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- REDUCIR EL TIEMPO DE FERMENTACION UTILIZANDO UN CATALIZADOR A BASE DE SEMILLAS DE GUAYABA SIN AFECTAR LAS PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS DEL MEZCAL.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- DESARROLLAR LA PRUEBA PILOTO DEL SUSTRATO A EMPLEAR.
- PREPARAR MEDIOS DE CULTIVO PARA EL DESARROLLO Y CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS LEVADURAS PRESENTES EN LA SEMILLA DE GUAYABA.

JUSTIFICACION

Se pretende optimizar el tiempo de fermentación del mezcal acortando el tiempo para así poder destilar el mosto formulado, y obtener una buena producción del mezcal. Realizando un método que sea factible y sustentable en el que no afecten las características organolépticas que se encuentran presentes en el mezcal.

En este caso la etapa a tratar será la de fermentación, en los cuales presenta problemas en cuanto al tiempo en que fermenta una tina de producción del mezcal, los días van desde 10-15 días, dependiendo también del clima en que se encuentre el sitio ya que en temporada de lluvia el tiempo puede incrementar.

La producción del mezcal es una de las escasas actividades industriales con que cuenta el estado de Oaxaca, a pesar de los obstáculos que esta presenta, entre los que destacan, la producción, el encarecimiento del agave y la adulteración del mezcal por parte de los productores, que para incrementar sus ingresos económicos no cumplen con frecuencia a lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-142-SSA1-1995 de bienes y servicios de bebidas específicamente bebidas sanitarias con relación a la salud de los consumidores y de una buena calidad en el producto del mezcal.

En la actualidad se manejan diversos tipos de agave, pero de los cuales, para su producción del mezcal, deben contar con un registro de guía que es emitido por el CRM y este a su vez certifica que el mezcal este en los rangos adecuados de, % Alc. Vol. Que están presentes en la NOM-070-SCFI-2016.

El proceso del mezcal se realiza en las siguientes etapas: siembra, cosecha, cocción, molienda, fermentación, destilación, rectificación y envasado. Cada una de estas etapas se realiza de forma artesanal y sin control de parámetros que afectan la calidad del producto, originando que el productor obtenga mezcal con características organolépticas diferentes.

MARCO TEORICO

¹CAPITULO 1. LEVADURAS Y SU ECOLOGIA EN LAS BEBIDAS FERMENTATIVAS

Las levaduras son hongos unicelulares de forma ovalada o alargada de 6 a 8 milésimas de milímetros. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetas (teleomórficas y anamórficas) y levaduras basidiomicetas (teleomórficas y anamórficas). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La célula de levadura está envuelta por una membrana exterior denominada pared celular que cumple con varias funciones, sirve como protección y en ella se establecen enzimas de vital importancia para el organismo.

Hay un gran número de bebidas fermentadas producidas espontáneamente por microorganismos autóctonos adaptados a la región los cuales utilizan materias primas disponibles en su hábitat. Algunas de estas bebidas se preparan a partir de productos de plantas (maíz, granos de café, cebada, lúpulo o uvas, caña de azúcar, malta, arroz, almidón de trigo o de maíz, algunas especies de agaves, etc.), debido a que contienen una gran cantidad de azúcares necesarios para la obtención del alcohol (Ponce y Bermeo, 2011; García et al., 2004, Molina, 2014).

Durante la fermentación espontánea de diversos sustratos se da una sustitución secuencial de distintas especies, de los cuales las levaduras autóctonas son los microorganismos principales que realizan la fermentación y otorgan a las bebidas el olor y sabor que las caracteriza; se pueden diferenciar distintas especies de levaduras durante la fermentación: en la primera fase, cuando el grado alcohólico es bajo, predominan las levaduras apiculadas, productoras de alcohol en bajo grado capaz de generar importantes concentraciones de ácidos volátiles (ácido acético).

¹ Jamai, L., Sendide, K., Ettayebi, K., Errachidi, F., Hamdouni-Alami, O., Tahri-Jouti, M., McDermott, T., Ettayebi, M. 2001. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 204: 375–379

²En la segunda y tercera fases de la fermentación las levaduras apiculadas son desplazadas en gran número por otras pertenecientes al género *Saccharomyces* principalmente, las cuales suelen tener forma elíptica e invaden rápidamente el medio, estas son bastante resistentes al alto grado de etanol producido durante el proceso de fermentación (Rodríguez, 2007; Molina, 2014).

1.1. METABOLISMO DE LA FERMENTACION

Las bebidas alcohólicas son elaboradas por el proceso de fermentación, el cual es llevado a cabo mediante distintas reacciones químicas a partir de la acción de levaduras y bacterias específicas para producir energía como parte de su metabolismo, estas consisten en reacciones redox que ocurren dentro de las células. El metabolismo celular comprende los metabolismos de síntesis o de formación de enlaces químicos para la elaboración de proteínas, lípidos, coenzimas y polisacáridos, y también las degradaciones de los compuestos como la digestión y la respiración celular. La fermentación se lleva a cabo por enzimas producidas por microorganismos fermentativos; principalmente levaduras, en el que ocurre la oxidación de sustancias orgánicas para producir alcohol, compuestos orgánicos y energía, es decir es una reacción exógena en la que se produce un cambio muy importante en la temperatura y hay un rápido desprendimiento de gases, derivado a esto nació la palabra fermentación que procede de la palabra latina *Fervere* (Arratia, 2009; Puerta, 2010; Fula, 2010; Ponce y Bermeo, 2011; Rodríguez, 2007).

Para que las levaduras tengan una producción óptima de metabolitos, estas necesitan asimilar, vía heterótrofa, carbono y nitrógeno, los cuales deben estar presentes en los sustratos utilizados para la fermentación. La fuente de carbono utilizada principalmente por estos organismos consiste en azúcares metabolizados por vías aerobias o anaerobias. En cuanto a las fuentes de nitrógeno utilizadas por las levaduras destacan principalmente los ácidos orgánicos, sulfato, fosfato y nitrato o aminoácidos. Otros elementos indispensables son: oxígeno, hidrógeno, fósforo y

² Jamai, L., Sendide, K., Ettayebi, K., Errachidi, F., Hamdouni-Alami, O., Tahri-Jouti, M., McDermott, T., Ettayebi, M. 2001. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 204: 375–379.

³magnesio, oligoelementos como potasio, calcio, silicio, azufre, hierro, cloro, boro, cobre, yodo, manganeso, molibdeno y zinc, y vitaminas como biotina, pantotenato de calcio, tiamina, etc. (Rodríguez, 2007).

El metabolismo fermentativo de las levaduras de manera habitual genera alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos, ésteres y compuestos azufrados e incluso fenólicos y algunos forman terpenos. Los glicólisis se realizan después del transporte de los azúcares sencillos fermentables que es catalizada por la acción consecutiva de 10 enzimas que permiten obtener piruvato a partir de glucosa o fructosa. Posteriormente, el piruvato es convertido a etanol a través de la fermentación alcohólica, una reacción con un solo intermediario, el acetaldehído, que es convertido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa. El segundo mayor productor de la fermentación es el glicerol, que es sintetizado a partir de la deshidroxiacetona fosfato al ser reducida a glicerol 3-fosfato, y posteriormente desfosforilada a glicerol, que, usado como fuente de carbono o energía, de igual manera protege a la célula contra altas temperaturas, estrés oxidativo y estrés hiper osmótico intracelular (Álvarez-Ainza *et al.*, 2009).

La mayoría de los aldehídos son sintetizados en la primera fase por oxigenación y una extendida pre-fermentación. En esta etapa el acetaldehído es producido como consecuencia de la ausencia de la enzima alcohol deshidrogenasa en las levaduras, que reducen el acetaldehído a etanol. Los acetales, así como varias cetonas, dicetonas e hidroxicetonas son sintetizados de este acetaldehído. La segunda etapa es empleada para generar acetales y cetales; en esta fase se intensifica la temperatura y la acidez. Los alcoholes superiores se forman de la transaminación de aminoácidos como leucina e iso-leucina, descarboxilación y reducción particularmente de los cetoácidos, por la ruta del metabolismo de Ehrlich, estos forman la mayoría de las sustancias aromáticas en la bebida. Existe también un alto

³ Jamai, L., Sendide, K., Ettayebi, K., Errachidi, F., Hamdouni-Alami, O., Tahri-Jouti, M., McDermott, T., Ettayebi, M. 2001. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*. 204: 375–379.

⁴número de ácidos grasos esterificados, de la primera fase de la fermentación (Álvarez-Ainza et al., 2009; Wondra y Berovic, 2001).

1.2. FASES DE CRECIMIENTO

El crecimiento de una levadura en un cultivo por lote se puede representar por medio de una curva que describa el cambio de la población con respecto al tiempo del cultivo, de la cual se pueden distinguir cuatro fases (Rodríguez, 2007; Bello, 2000):

- Fase de latencia: Constituye el periodo de adaptación de la levadura a un nuevo entorno (nutrientes, temperatura, pH, etc.), como lo es el medio en el que se desarrolla. La duración de esta fase es muy variable y depende del tamaño del inóculo y del estado fisiológico de las células, además el número de células inoculadas permanece constante, o incluso disminuye.
- Fase exponencial: En esta etapa se intensifica la actividad metabólica celular, y se caracteriza por el número de divisiones celulares (mediante mitosis) que aumenta exponencialmente. La duración de esta etapa depende de la especie de levadura y de las condiciones medioambientales, ésta se detiene al verse limitada por el agotamiento de los nutrientes disponibles en el medio o por la acumulación de compuestos tóxicos derivados de su propio metabolismo.
- Fase estacionaria: Se da cuando los nutrientes comienzan a ser escasos al final de la fase anterior, implica un equilibrio entre células no viables (muertas) por la falta de nutrientes y metabolitos tóxicos, y células viables que aún se siguen dividiendo, de manera que el número de células vivas permanece constante.
- Fase de decadencia o muerte: El agotamiento de reservas energéticas, entre otros factores, provocan la muerte y lisis celular, que finalmente inducen a

⁴ Garzón, S. y C. Hernández. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. 132 pp.

⁵que el número de individuos no viables supere a los viables y va aumentando exponencialmente.

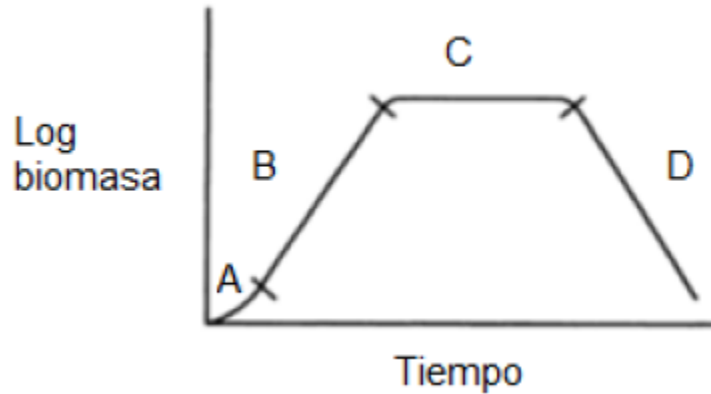


Figura 1. Fases ocurridas durante el crecimiento de un microorganismo. A) Fase de latencia, B) Fase logarítmica, C) Fase estacionaria, D) Fase de muerte.

1.3. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso determinante en la composición final del producto, la fermentación alcohólica, tiene como producto principal el etanol a partir de un mosto azucarado, en el proceso no solo intervienen microorganismos para un buen resultado, si no también influyen muchas condiciones externas necesarias para que se lleve a cabo un proceso idóneo; se requiere un medio anaerobio, una temperatura adecuada, pH y acidez óptimos, de manera que los microorganismos puedan actuar correctamente sobre los azúcares y la fermentación sea correcta (Coronel, 2008; Molina, 2014).

- TEMPERATURA

La temperatura es de los requerimientos más importantes que afectan directamente al proceso fermentativo, la sucesión y el proceso metabólico de los microorganismos

⁵ Garzón, S. y C. Hernández. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. 132 pp.

⁶involucrados. Cada uno de ellos, necesita distintos parámetros de temperatura para realizar sus ciclos. Esta condición debe controlarse pues durante la misma se produce un relativo aumento de esta, la temperatura no debe ser muy baja debido a que la fermentación será lenta, si la temperatura excede de los 35°C disminuye la acción de las levaduras y si esta aumenta por encima de los 40°C esta se puede detener, se recomienda como temperatura óptima los 27°C (Molina, 2014; Rodríguez, 2007; Coronel, 2008).

- PH

El crecimiento de la levadura y la velocidad de fermentación tiene su máximo de rendimiento de acuerdo con la formación del producto y el crecimiento de la levadura a valores de pH entre 3.05 hasta 3.50, en una fermentación alcohólica, el pH varía normalmente entre un mínimo de 2.8 y un máximo de 3.8 (Molina, 2014).

- AIREACIÓN

Se pueden llevar a cabo dos tipos de metabolismos quimiorganotróficos: la fermentación y la respiración. En presencia de oxígeno, los microorganismos crecen eficazmente sobre el azúcar formando biomasa y CO₂ (respiración), y en ausencia de oxígeno cambian a un metabolismo anaeróbico (fermentación) que origina menor cantidad de biomasa y mayor cantidad de alcoholes, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular (Molina, 2014; Garzón y Hernández, 2009).

- NUTRIENTES

Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. Las necesidades

⁶ Garzón, S. y C. Hernández. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. 132 pp.

⁷nutricionales de las levaduras buscan medios de cultivo que aporten los elementos necesarios para la síntesis de los tejidos celulares y para cubrir las necesidades energéticas de las levaduras (Garzón y Hernández, 2009).

1.4. PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA FERMENTACIÓN

La importancia del proceso de fermentación alcohólica no trata únicamente de la generación de etanol a partir de los azúcares fermentables, sino que durante la fermentación se forman una amplia diversidad de metabolitos secundarios que influyen en la calidad y tipo de cada bebida alcohólica. Las fermentaciones alcohólicas espontáneas involucran en la producción de los compuestos de aroma, principalmente a los denominados géneros de levaduras no-Saccharomyces (Álvarez-Ainza et al., 2009).

La concentración de compuestos en las fermentaciones espontáneas depende de microorganismos responsables de la fermentación alcohólica en el proceso, además de la composición de la materia prima usada como sustrato. En las bebidas provenientes de plantas, como el mezcal, la fermentación depende de la savia y jugos de la planta, las especies de palma y agave, las condiciones ambientales como la temperatura y la velocidad del viento (Santiago-Urbina, et al., 2013; Verdugo, 2013).

Entre los compuestos que se forman están las grandes familias de alcoholes superiores, carbonilos como los aldehídos, los ésteres, los ácidos orgánicos, las grasas y los compuestos con azufre. En la mayoría de las bebidas alcohólicas, los compuestos responsables del olor y el sabor son los volátiles. Los alcoholes y los ésteres son cualitativamente los más importantes, sin embargo, su impacto en el aroma no es el mismo. Los alcoholes son compuestos que individualmente no tienen un olor marcado, pero cuando están diluidos refuerzan el aroma. Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal, en especial los ésteres de ácidos grasos

⁷ Carrau, F. 2005. Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. *Agrociencia*. 1: 387-399.

⁸de cadena corta. La capacidad de generar alcoholes superiores es una propiedad de todas las levaduras, pero la cantidad varía en función del género, de la especie y de la cepa (Suárez, 2002; Álvarez-Ainza et al., 2009).

Para estudiar individualmente los componentes de la fracción aromática de las bebidas alcohólicas se requiere el empleo de una técnica de separación del contenido de esta; actualmente se utiliza la cromatografía de gases para la separación de sustancias volátiles presentes en bajas concentraciones y posterior cuantificación, estos disponen de detectores muy sensibles (Gil, 1997).

1.5. FUNDAMENTO DE ELABORACIÓN DEL SUSTRATO

Esta investigación, realizada por José Daniel Mera Ayala y Jorge Eduardo Angulo, ingenieros agroindustriales de la Universidad Nacional de Colombia (U.N.) Sede Palmira, y por la docente Liliana Serna Cock también de la Institución, recibió la patente de invención por parte de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC), que protege la formulación del sustrato y su utilización.

El propósito del estudio fue encontrar alternativas para reemplazar la fuente de nitrógeno que forma parte de la formulación en procesos de fermentación tanto alcohólica como ácido láctico, y con esto bajar los costos de producción. Los residuos agroindustriales generados por el procesamiento de la guayaba –es decir las semillas– tienen un alto nivel de vitaminas y un 7,71 % en contenido de proteínas, que indican que la cantidad de nitrógeno también es alta.

Para utilizar la semilla se realiza un proceso de secado y molido, luego del cual se evalúa como fuente de nitrógeno, en fermentación alcohólica, para obtener alcohol; y ácido láctico para obtener ácido láctico.

Al final de los procesos de fermentación el sustrato de harina de semillas de guayaba demostró resultados similares, es decir que se puede obtener la misma

⁸ Carrau, F. 2005. Levaduras nativas para enología de mínima intervención. Biodiversidad, selección y caracterización. *Agrociencia*. 1: 387-399.

⁹cantidad de alcohol y ácido láctico, y en el mismo tiempo, que usando sustratos convencionales.

En términos de costo, teniendo como referente el uso de urea como sustrato convencional para las fermentaciones, este disminuye cerca del 30 % para la fermentación alcohólica, y entre 70 % y 80 % para la fermentación ácido-láctica.

“Estas semillas aportan vitaminas adicionales que pueden contribuir al crecimiento de las levaduras y mejorar la producción y el rendimiento del alcohol”, menciona el ingeniero. La harina de semillas de guayaba es una fuente viable económica y ambientalmente, pues evita la contaminación generada por los residuos al ser desechados, y un valor agregado para los productores de ese sector de la industria. Esta investigación se desarrolló como trabajo de pregrado del Programa de Ingeniería Agroindustrial de la U.N. Sede Palmira, y pertenece al grupo de investigación bacterias ácido-lácticas y sus aplicaciones biotecnológicas industriales coordinado por la profesora Liliana Serna Cock.

⁹ Capello, M., Blevé, G., Grieco, F., Dellaglio, F., Zacheo. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal Applied Microbiology*. 97: 1274-1280.

CAPITULO 2. GENERALIDADES DEL AGAVE

¹⁰2.1. DESCRIPCION DEL AGAVE

En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, abono y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos. Los magueyes fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica para alimentarse, de lo cual se hallan restos en cuevas en el Valle de Oaxaca, el de Tehuacán y en Coahuila.

Agave, del griego “Admirable” o “Noble” es el nombre que denominó Carl von Linné a un grupo de plantas llevadas al Nuevo Mundo en Europa. El agave es una planta de hojas radicales largas, triangulares, carnosas, terminadas en un fuerte aguijón y flores amarillentas en ramillete sobre un bohordo central, es originaria de México, se emplea en la fabricación de fibras textiles y en la elaboración de pulque, mezcal y tequila.

Su área de origen es la región árida repartida entre el norte de México y el sur, se estima que el género empezó a diversificarse hace 12 millones de años, por lo cual ha logrado una enorme diversidad de especies, superando las 300. Recibe numerosos nombres comunes como agave, pita, maguey, cabuya, fique o mezcal, entre los más conocidos.

Las especies del género son muy parecidas en cuanto a su forma y crecimiento, forman una gran roseta basal de hojas gruesas y carnosas, en algunos casos de gran tamaño, que se sitúan en espiral alrededor de un tallo corto en relación con su longitud, por lo que aparentan nacer directamente desde el terreno. Generalmente están armadas de robustas espinas leñosas y aplanadas en los márgenes, y una cónica, solitaria, rematando el ápice.

¹⁰ Domingo García, *Le mezcal, Enfant terrible du Mexique*, Tours, Presses Universitaires François Rabelais, 2018.

¹¹Muy pocas especies carecen de espinas. Su crecimiento es lento y finaliza con la floración, son monocárpicas. La planta desarrolla un escapo floral, más alto que las hojas, y en el mismo año florece, fructifica y muere. La mayoría de las especies desarrollan gran cantidad de hijuelos basales alrededor de la roseta original, formando espesas colonias que van desarrollándose y fructificando.



Imagen 1. Diversidad de Agaves

2.2. CULTIVO DEL AGAVE

Los agaves requieren un clima semiseco, con temperaturas promedio de 22°C, generalmente a la altitud entre 1500 y 2000 m.s.n.m.

Las características del suelo para un crecimiento óptimo deben ser: arcilloso, permeable y abundante en elementos derivados del basalto y con presencia de hierro, preferentemente volcánico. Es muy importante la exposición al sol; sin superar los 100 días nublados al año, y preferentemente, solo 65 días.

¹¹ Domingo García, *Le mezcal, Enfant terrible du Mexique*, Tours, Presses Universitaires François Rabelais, 2018.

¹²La reproducción se puede dar por semilla o bulbillo, o más eficientemente mediante rizomas, es decir, trasplantando los hijuelos que brotan de la raíz de la planta. Al alcanzar una altura de 50 cm, y cuando el corazón tiene unos 15 cm, se desprende de la planta madre.

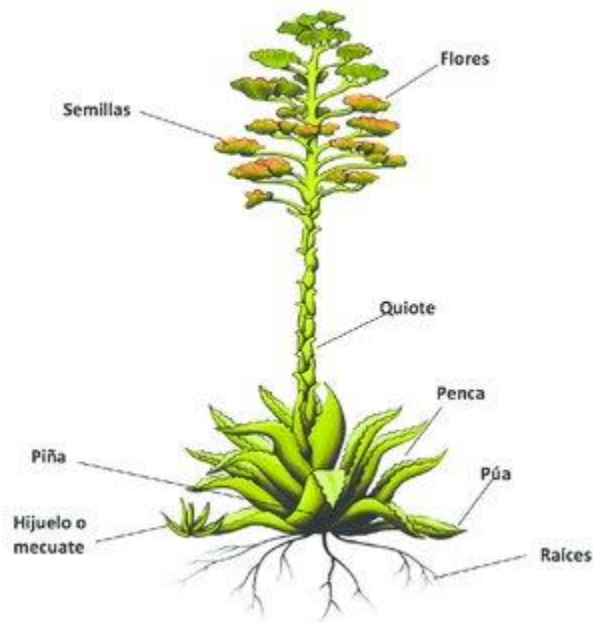


Imagen 2. Morfología del Agave

La edad óptima de reproducción es entre los 3 y los 5 años, anualmente puede producir entre uno y dos hijuelos, los cuales, una vez separados, se deben plantar, cubriendo un 75 % de su volumen con el sustrato. Este tipo de reproducción produce una copia idéntica de la planta madre (clon), por eso el uso extensivo de este método puede poner en riesgo la diversidad genética de estas plantas, tal el caso del agave tequilana que perdió toda su diversidad.

¹² Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. www.cesaveg.org.mx

2.3. MORFOLOGIA DEL AGAVE

¹³Los magueyes o agaves son plantas xerofitas, adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables con largos periodos de sequía y altas temperaturas. Sus características morfológicas hacen de la planta tenga condiciones favorables para su estructura básica a las condiciones del ambiente. Los agaves poseen estrategias para sobrevivir en ambientes secos o periódicamente secos, especialmente en el suelo, con fuertes temperaturas entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularse en tejidos especializados.

Los componentes principales de esta planta son:

1. Tallo: El tallo del agave, también llamada piña o corazón de agave mide desde 20 hasta 90 cm de longitud.
2. Hojas: Las hojas maduras generalmente miden de 60-120 cm de longitud. El ancho de la misma hoja está dentro de 3.5-10 cm. Tienen una forma lineal y terminan en forma de punta de lanza. Son rígidas, carnosas y con una cutícula dura fibrosa y ascendente a horizontales. Tienen un color entre verde claro y azul verdoso, un tanto grisáceo.
3. Espinas o Dientes: Son generalmente pequeños, midiendo de 2-5 mm de longitud espaciados uniformemente, muy cercanos o bien separados, comúnmente de color café de 1.5-3.5 cm de longitud.
4. Quiote o Canícula: Crece desde el centro de la piña cuando la planta está madura, preparada para echar semilla y posteriormente morir, llega a medir entre 3-5 m de alto, generalmente abierta.
5. Flores: Varían su color de verdes a amarillas, midiendo de 50-65 mm de longitud y tienden a secarse rápidamente.

¹³ Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. www.cesaveg.org.mx

¹⁴Semillas: Son grandes, color negro mate, de 9-12 mm de longitud x 7-8 mm de ancho, tiene un corte con una hendidura a lo largo de la semilla.

2.4. ENFERMEDADES DEL AGAVE

- PICUDO DEL AGAVE

Las larvas son de color blanco cremoso, en forma de una C sin patas, con cuerpo segmentado y estriado, miden de 1 a 2 cm de largo, con cabeza grande y dura, presentan en un extremo dos prolongaciones pequeñas. El adulto es de color negro brillante, mide de 1.5-2.5 cm de largo, con pico bien desarrollado y encurvado. Los adultos se encuentran en la base de las pencas, así como dentro de las piñas, generalmente en aquellas que están en proceso de descomposición debido al ataque de las larvas. El daño inicial se nota por perforaciones y secreciones gomosas en el cogollo y/o la penca, formando galerías y causando pudrición blanda.

- GUSANO BLANCO DEL MAGUEY

Las larvas empiezan hacer galerías del tercio superior de la penca para salir y continuar haciendo galerías en la base de la penca. La larva bien desarrollada se dirige a la base de las pencas para pupar, antes de esto construye un opérculo sedoso (ventana) por donde emergerá el adulto. El daño en agave tequilero se manifiesta en una reducción en el crecimiento de la planta, una marchitez precoz, áreas necróticas en las pencas y muerte de éstas (González et al., 2007).

- BARRENADOR DE PENCAS DEL AGAVE

Es una especie con un hábito de daño muy similar al de gusano blanco. El cuerpo y las alas de los adultos son de color negro, con una franja blanca en ambas alas.

Esta especie puede ser importante en plantaciones recién establecidas, ya que en una planta pueden hacer hasta 10 perforaciones o minas por penca hasta llegar a

¹⁴ Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. www.cesaveg.org.mx, 2017.

¹⁵la piña, sin matar a la planta. Reduce la calidad de ésta y sus daños son puntos de entrada de hongos y bacterias (González et al., 2007).

- PIOJO HARINOSO

Es conocido como algodoncillo. El piojo harinoso se puede presentar atacando la zona radicular, base de las hojas, hasta las hojas del cogollo (González et al., 2007). Durante los meses de sequía se ha detectado en el mesontle, que es la unión de las pencas y la piña, succionando los jugos y decolorando la piña, causando el síntoma de falsa madurez.

2.5. MAGUEY ESPADIN (AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW)

Al igual que el resto de los agaves, *A. Angustifolia* posee como característica biológica un ciclo de vida largo, pues en general tarda alrededor de 6 a 8 años que se produzcan frutos con semilla. Morfológicamente *A. Angustifolia* consiste en rosetas cespitosas ampliamente abiertas de 1.0 a 1.5 m de alto por 1.5 a 2.0 m de diámetro, con tallos desde 20 a 60 cm de largo. Sus hojas maduras tienen formas que varían de lineales a lanceoladas de 60 a 120 por 3.5 a 10 cm.

Es la especie más ampliamente cultivada en Oaxaca. Las plantaciones cubren gran parte de los distritos de Yautepec, Tlacolula, Miahuatlán, Ejutla y Ocotlán; en otros distritos como Centro, Villa Alta, Sola de Vega, Zimatlán, Zaachila, Tehuantepec y Nochixtlán las plantaciones cuentan con menor cobertura y por lo general se les intercala con los cultivos básicos o con otras especies de Agave. El maguey espadín se adapta fácilmente a las condiciones nutricionales y climáticas adversas y requiere de altas intensidades lumínicas para compensar estas dificultades.

Los mezcales de Oaxaca son en su mayoría de espadín cultivado, que se utiliza por su alta producción de azúcares, tiempo breve de maduración y fácil propagación por hijuelos obtenidos de plantas adultas en cultivo y bulbillos, cuyo desarrollo se induce al cortar las flores de plantas en reproducción.

¹⁵ Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. www.cesaveg.org.mx, 2017.



Imagen 3. Agave Angustifolia Haw.

Las plantas de cultivo son todas de la misma edad. La temporada de siembra comienza en los meses de abril o mayo, antes del inicio de las lluvias. Al llegar a la madurez, a partir de 8 o hasta 12 años, la planta acumula energía en forma de azúcar en su corazón o piña, materia esencial para obtención del alcohol.

Se han encontrado piñas de maguey con abundante porcentaje de azúcares, el maguey espadín por lo regular su rango es de 20 a 45% de azúcar, considerado como abundante, comparado con el maguey tobalá, las piñas varían de 20 a 25 % de azúcar.

CAPITULO 3. BEBIDAS ALCOHOLICAS

¹⁶3.1. DEFINICIÓN DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

El mezcal es una bebida alcohólica, la norma de salud la define como bebida alcohólica, aquella obtenida por fermentación, principalmente alcohólica de la materia prima que sirve como base utilizando como levaduras del género *Saccharomyces*, sometida o no a la destilación, rectificación, maceración o cocción en presencia de productos naturales, susceptibles de ser añejadas que pueden presentarse en mezclas de bebidas alcohólicas y pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos por la Secretaria de Economía (SCFI) con una graduación alcohólica de 2% a 55% de alcohol volumen a 20°C (293°K).

3.2. CLASIFICACION DE LAS BEBIDAS ALCOHOLICAS

Las bebidas alcohólicas se clasifican en dos tipos de acuerdo con su proceso de elaboración, las fermentadas no destiladas y las fermentadas destiladas.

- a) Bebidas fermentadas no destiladas: Son las procedentes de frutos o de cereales, uvas, manzanas, peras, cebadas, etc. Que por acción de acción de ciertas levaduras convierten el azúcar en alcohol etílico, así se obtiene la cerveza, el vino, la sidra, etc.

- b) Bebidas fermentadas destiladas: Se consiguen eliminando, mediante el calor, una parte del agua contenida en las bebidas fermentadas. El principio básico de la destilación reside en el punto de ebullición del agua y el alcohol, ya que el alcohol se evapora a 78°C y el agua tiene un punto de ebullición de 100°C, factor que permite concentrar el alcohol, dado su bajo punto de ebullición.

¹⁶ Ley de la Propiedad Industrial, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de agosto de 1994.

¹⁷Se deduce que los mayores componentes de la destilación son el alcohol etílico (C_2H_5OH) y otros alcoholes superiores. La combinación de estas dos sustancias en una mezcla directa se produce una bebida agradable al paladar, aunque esto cambia al agregarle componentes característicos de las regiones en los que son fabricados para su atractivo consumo.

Entre las bebidas destiladas conocidas se encuentran el whisky, el vodka, el ron, el tequila, la ginebra y el mezcal.

3.3. DEFINICION DEL MEZCAL

El mezcal del Náhuatl “Mexcalli” (pencas de maguey cocidas) de “Metl” (maguey) e “Ixcalli” (cocido). Es una bebida que se encuentra definida en la Norma Oficial Mexicana “NOM-070-SCFI-2016. BEBIDAS ALCOHOLICAS, MEZCAL-ESPECIFICACIONES”; misma que regula su producción y comercialización, y que al pie lo señala como:

Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizados o cocidas, y sometidas a fermentación alcoholiza con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido, para el caso del Mezcal, con hasta en 20% de otros carbohidratos en la preparación de dichos mostos siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto, no permitiéndose las mezclas en frío.

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

¹⁷ Ley de la Propiedad Industrial, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de agosto de 1994.

3.4. CLASIFICACIÓN DEL MEZCAL

¹⁸El mezcal se clasifica de acuerdo con el porcentaje de carbohidratos provenientes del agave, que se utilicen en la elaboración del mezcal. En la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, bebidas alcohólicas mezcal-especificaciones, se clasifica para el mezcal en dos tipos:

TIPO 1) Mezcal 100% Agave. Elaborado de los mostos que únicamente contienen azúcares provenientes de los agaves.

TIPO 2) Mezcal con otros azúcares. Elaborado con un 80% de los mostos de los agaves, a los que se les adiciona un 20% de otros azúcares.

Ambos tipos de mezcal son susceptibles de calificarse según las siguientes categorías:

- 1) JOVEN: Mezcal obtenido directa y originalmente con los azúcares extraídos de los agaves, susceptible de ser enriquecido para el caso del mezcal tipo 2 hasta con 20% de otros azúcares.
- 2) REPOSADO: Mezcal que se almacena por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino para su estabilización, puede ser abocado.
- 3) AÑEJO: Mezcal sujeto a un proceso de maduración de por lo menos 1 año en recipientes de madera de roble blanco o encino.
- 4) MEZCAL DE PECHUGA: Mezcal que en el proceso de destilación se le adicionan frutas, ciruelas, piña y manzana, razón por la cual el mosto es resultante, después de la destilación, confiere al mezcal de pechuga su sabor dulce y afrutado.
- 5) MEZCAL DE GUSANO: Mezcal joven o reposado al que se le adiciona el gusano de maguey previamente tostado, dejándolo reposar de un mes a dos meses hasta obtener el sabor y olor característico a gusano de maguey.

¹⁸ Ley de la Propiedad Industrial, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de agosto de 1994.

CAPITULO 4. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL MEZCAL

¹⁹4.1. MEZCAL

El mezcal es una bebida tradicional obtenida de la fermentación y destilación del jugo de agave, preparado a partir de azúcares extraídos de las “cabezas” o “piñas” (tallo o eje floral con hojas cortadas) maduras y cocidas, provenientes de diferentes especies de agave, que se encuentren en la zona de denominación de origen: *Agave angustifolia* Haw, *A. potatorum* Zucc., *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp *crassispina* (Trel.) Gentry., *A. americana* L., *A. americana* var. *oaxacensis*, *A. cupreata* Trel. & Berger, *A. durangensis* Gentry, *A. karwinskii* Zucc., *A. marmorata* Roezl, *A. maximiliana* Baker, *A. rhodacantha* Trel., *A. inaequidens*, *A. lophanta* y *A. tequilana* Web. (Vera *et al.*, 2009; CONABIO, 2006).

4.2. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DEL MEZCAL

La composición química de los agaves varía entre especies y en función de las condiciones del horno de cocimiento; *A. angustifolia* registra un pH de 4.5 con 27°Brix mientras que en *A. potatorum* registra un pH 5.5 con 22°Brix (Vera *et al.*, 2009).

La fuente de azúcar característica de los mostos de agave es la fructosa. Esta se obtiene por hidrólisis de un tipo de polisacárido, la inulina, durante el proceso de cocción, durante el proceso fermentativo que llevan a cabo los microorganismos, se transforman los monosacáridos del agave en etanol por medio de fermentación alcohólica. Los principales minerales que se encuentran en estos mostos son el calcio, el magnesio y el fosfato. Se lleva a cabo también la destilación, donde se efectúa la separación del alcohol y el agua, aprovechando para ellos los diferentes puntos de ebullición, separando el metanol, el etanol y finalmente el propanol y butanol (Durán *et al.*, 2007; Hernández, 2009).

¹⁹ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), “La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña”, Observatorio de la Economía Latinoamericana.

4.3. COCCIÓN

²⁰La cocción se lleva a cabo para hidrolizar o transformar los fructanos en fructosa, monosacárido apropiado para que se lleve a cabo la fermentación. Esta operación se lleva a cabo en un horno construido a partir de un agujero cavado en la tierra. Los materiales utilizados son los siguientes:

1. Leña: Aunque generalmente se utiliza madera de pino, el tipo de leña utilizada depende del sabor que se le quiera dar al mezcal.
2. Piedras: Comúnmente se utilizan piedras de río debido a su capacidad de soportar las temperaturas requeridas para la cocción (800-1000° C).
3. Bagazo de maguey: Se moja antes de ser utilizado y tiene la finalidad de distribuir uniformemente la temperatura a través del horno.
4. Tierra: Se utiliza para cubrir o tapar el horno.
5. Petate o lona
6. Troncos de madera a la orilla del horno.

Para realizar la cocción se siguen los siguientes pasos:

1. Se coloca la leña en forma de montaña, dejando en el centro un círculo.
2. Después las piedras alrededor de la leña son apiladas.
3. Se arroja en el centro del círculo gasolina para que empape la leña, después se tira un ocote encendido para iniciar el fuego. Durante un lapso el horno tendrá alimentación de potencial calorífico por parte de la leña a las rocas hasta que las mismas alcancen una coloración roja intensa para esto deben transcurrir de 6 a 10 horas.
4. A continuación, como protección para que, al momento de colocar el agave, las piñas que tendrán contacto directo con el fuego se colocará bagazo humedecido.

²⁰ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

²¹5. Se colocan las piñas partidas a la mitad o en cuartos, dependiendo de su tamaño original. Apilándolas alrededor de las piedras hasta ver colocado toda la materia prima. Se coloca los tramos de petate y las lonas cubriendo en maguey para evitar pérdidas de calor.

6. Posteriormente con palas y picos se afloja la tierra alrededor del horno, para después con dicha tierra cubrir las piñas de maguey, hasta tener un espesor considerable de tierra que no deje escapar el vapor dentro del horno y tenga una mejor cocción.

7. Se espera de tres a cuatro días o dependiendo de las condiciones climáticas (lluvia), para que el cocimiento de las piñas se lleve a cabo de manera adecuada.

Además, debe vigilarse que el horno esté bien cubierto, ya que la entrada de oxígeno puede provocar que las piñas se quemen.

4.4. MOLIENDA

La cocción se lleva a cabo para hidrolizar o transformar los fructanos en fructosa, monosacárido apropiado para que se lleve a cabo la fermentación. Esta operación se lleva a cabo en un horno construido a partir de un agujero cavado en la tierra. Los materiales utilizados son los siguientes:

1. Leña: Aunque generalmente se utiliza madera de pino, el tipo de leña utilizada depende del sabor que se le quiera dar al mezcal.
2. Piedras: Comúnmente se utilizan piedras de río debido a su capacidad de soportar las temperaturas requeridas para la cocción (800-1000° C).
3. Bagazo de maguey: Se moja antes de ser utilizado y tiene la finalidad de distribuir uniformemente la temperatura a través del horno.
4. Tierra: Se utiliza para cubrir o tapar el horno.
5. Petate o lona

²¹ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

²²6. Troncos de madera a la orilla del horno.

Para realizar la cocción se siguen los siguientes pasos:

1. Se coloca la leña en forma de montaña, dejando en el centro un círculo.
 2. Después las piedras alrededor de la leña son apiladas.
 3. Se arroja en el centro del círculo gasolina para que empape la leña, después se tira un ocote encendido para iniciar el fuego. Durante un lapso el horno tendrá alimentación de potencial calorífico por parte de la leña a las rocas hasta que las mismas alcancen una coloración roja intensa para esto deben transcurrir de 6 a 10 horas.
 4. A continuación, como protección para que, al momento de colocar el agave, las piñas que tendrán contacto directo con el fuego se colocará bagazo humedecido.
 5. Se colocan las piñas partidas a la mitad o en cuartos, dependiendo de su tamaño original. Apilándolas alrededor de las piedras hasta ver colocado toda la materia prima. Se coloca los tramos de petate y las lonas cubriendo en maguey para evitar pérdidas de calor.
 6. Posteriormente con palas y picos se afloja la tierra alrededor del horno, para después con dicha tierra cubrir las piñas de maguey, hasta tener un espesor considerable de tierra que no deje escapar el vapor dentro del horno y tenga una mejor cocción.
 7. Se espera de tres a cuatro días o dependiendo de las condiciones climáticas (lluvia), para que el cocimiento de las piñas se lleve a cabo de manera adecuada.
- Además, debe vigilarse que el horno esté bien cubierto, ya que la entrada de oxígeno puede provocar que las piñas se quemen.

²² Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

4.5. FERMENTACIÓN

²³En la fermentación los azúcares contenidos en las piñas se transforman en etanol por medio de la fermentación alcohólica, ruta metabólica propia de las levaduras.

Esta operación se lleva a cabo en tinas de madera durante un tiempo aproximado de ocho a diez días, tomando en consideración la temperatura ambiente.

Los pasos por seguir durante la fermentación son los siguientes:

1. Adición de agua caliente: Cuando se termina de colocar la pulpa triturada se adiciona agua caliente con la finalidad de crear el ambiente apropiado para el crecimiento de los microorganismos. La cantidad de agua incorporada es de aproximadamente 140 litros. Finalizada esta operación, debe esperarse aproximadamente por veinticuatro horas a que alcance el estado apropiado o punto para la etapa siguiente. Este estado se caracteriza por la presencia de espuma al abrir la capa de pulpa que cubre la tina y por la existencia del sonido característico de un burbujeo intenso y uniforme en toda la tina.

2. Adición de agua fría: Alcanzado el estado anterior, es necesario regular el crecimiento de los microorganismos con la finalidad de que no exista una transformación acelerada a alcohol de forma que pueda originarse ácido acético de manera posterior. Para esto se requiere adicionar agua fría en una cantidad aproximada de 300 litros. Tras esta operación debe esperarse aproximadamente dos horas y media para la aplicación de la siguiente etapa.

3.- Revoltura: Ya controlado el crecimiento microbiano, debe efectuarse una homogeneización de tal forma que no existan zonas donde la fermentación sea menor o no exista. Para esto se lleva a cabo el mezclado del contenido de la tina, para esto se necesitan dos herramientas simples: el biello, con el cual se separan las capas fibrosas que formarán en bagazo y un palo de madera que se utiliza para

²³ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

realizar la mezcla. Después de realizada la operación debe esperarse por espacio de 36 horas para aplicar la siguiente fase.

4. Detención de la fermentación: En este paso la intención es alentar lo más posible el ritmo de trabajo de los microorganismos fermentadores. Para esto se permite la entrada de oxígeno a las tinajas de fermentación efectuando el levantamiento de la capa superior de la pulpa que cubre la demás materia fermentada.

4.6. DESTILACIÓN

²⁴En esta operación se efectúa la separación del alcohol del agua aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. El etanol, debido a estructura molecular, tiene un punto de ebullición más bajo que el agua (78.5°C a nivel del mar), por lo tanto, se separa de ésta al alcanzar esta temperatura.

El dispositivo utilizado para la destilación es el alambique. Este equipo está conformado por cuatro elementos fabricados en cobre debido a su alta conductividad térmica, de tal forma que facilita la transferencia de calor calentándose y enfriándose fácilmente alcanzando así la temperatura apropiada de separación. Las partes que conforman el alambique son:

1. Olla: Esta parte se encarga de contener la mezcla de sustancias a separar, se encuentra enterrada dentro de una estructura cúbica debajo de la cual se colocan leños que generan el calor requerido para la separación del alcohol.
2. Montera: Se encarga de captar los vapores generados tras el calentamiento de la mezcla y los conduce a la siguiente sección. Por su forma, también se le conoce como “campana”.

²⁴ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), “La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña”, Observatorio de la Economía Latinoamericana.

²⁵3. Turbante: Es un tubo alargado y se encarga de conducir los vapores hacia la sección de enfriamiento.

4. Serpentín: Es un tubo en forma de espiral que se encuentra inmerso en un tanque con agua. Tiene la finalidad de enfriar y, por lo tanto, de condensar los vapores provenientes de la olla.

Los pasos para llevar a cabo la destilación son los siguientes:

1. Llenado de la olla: Con una capacidad de aproximadamente 250 litros. La olla del alambique debe ser llenada con tepache (nombre que se le da al líquido contenido en la tina de fermentación) y bagazo en proporción de 2 a 1, esto es, dos partes de tepache (160 litros, aproximadamente) por parte de bagazo (80 kilogramos, aproximadamente). Es importante mencionar que, además de su aporte alcohólico, el bagazo impide que el vapor salga de manera violenta, arrastrando consigo tepache sin destilar.

2. Armado del alambique: Se colocan la montera y el turbante conectados entre sí y con las partes restantes, se sellan perfectamente todos los sitios de conexión con una especie de pasta llamada masilla, la cual proviene de los residuos del maguey después de la destilación. La finalidad del sellado es la de evitar el escape de vapor el cual, además de causar pérdidas de alcohol, generan un descenso en la presión, provocando que el mezcal que se obtiene salga con menos fuerza, retrasando la operación.

3. Calentamiento y regulación del calor: Se encienden los leños para generar el calor y se espera por espacio de media hora a que salga un chorro delgado de alcohol el cual se recolecta en garrafones.

Aquí es muy importante el control de la temperatura, debido a que una temperatura muy alta o baja tiene repercusiones negativas en la obtención del mezcal:

²⁵ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

²⁶• Una temperatura muy alta puede causar el arrastre de tepache a los garrafones, además de que calienta demasiado el agua de enfriamiento perdiendo su eficiencia de condensación.

- Una temperatura muy baja provoca que el líquido salga en forma cortada o que simplemente no salga.

Este control se lleva a cabo mediante la adición o eliminación de leños, o bien agregando agua a los leños encendidos para descender la temperatura. El resultado de estas acciones se ve reflejado en el tamaño de chorro, debiendo ser delgado y no salir de manera cortada.

Generalmente se obtienen tres garrafones por olla, reduciéndose su contenido alcohólico por garrafón. Al alcohol o mezcal del primer garrafón se le conoce con el nombre de punta y tiene una graduación alcohólica de 60° G. L. (60% v/v). Al mezcal contenido en los dos garrafones siguientes se les conoce con el nombre de xixe (se pronuncia shishe) y tienen una graduación alcohólica de 30° G. L. (Gay Lusacc) aproximadamente. Estos últimos garrafones se destinan a otra operación llamada refinación, la cual se explica más adelante.

- Vaciado de olla: Llenados los tres garrafones, la olla se encuentra lista para ser vaciada y cambiarse su contenido. Para ello se apaga el fuego y se desarma el alambique.

- Se extrae el bagazo usando un biello y por medio de la carretilla se transporta y se acomoda en montones afuera del palenque. Este bagazo se seca y se destina, entre otras cosas, a la elaboración de composta.

- Posteriormente se drena el líquido restante destapando una abertura existente en la parte inferior de la olla. Es importante mencionar que esta abertura debe estar bien tapada en el momento de la destilación para evitar salidas de vapor antes mencionadas.

²⁶ Ramales Osorio, Martín Carlos (2004), "La Industria Manufacturera dentro de la Estructura y la Dinámica de la Economía Oaxaqueña", Observatorio de la Economía Latinoamericana.

- Este paso se realiza hasta que se agota todo el contenido de la tina de fermentación. Finalmente se extrae el bagazo, el líquido y se apaga completamente el fuego.

²⁷4.7. RECTIFICACIÓN

Al mezcal obtenido en la operación anterior se le llama mezcal de primera destilación. Como se mencionó anteriormente, los últimos garrafones de la primera destilación tienen una graduación de alcohol baja para los requerimientos del envasado (43° G. L.), de ahí que necesiten refinarse para elevar su contenido de alcohol.

El equipo que utilizar es el mismo que en la destilación y los pasos a seguir son similares a los de la destilación, así que se mencionarán únicamente las variantes:

1. Llenado: La olla se llena con aproximadamente 220 litros de xixe obtenido anteriormente.
2. Calentamiento y control del calor: Aquí el control del calor debe ser más estricto que en el paso anterior, debido que no existe barrera alguna que detenga la salida violenta de vapor, existiendo mayor probabilidad de pérdidas de alcohol. El alcohol de salida va desde los 80°G. L. hasta la obtención de agua destilada, la cual se conoce con el nombre de “cola”.
3. Vaciado de la olla: Para esto únicamente se destapa la salida lateral inferior de la olla; esta es una etapa única, es decir, no existe cambio de contenido.

²⁷ Navarrete-Bolaños, J.L.; Jiménez-Islas, H.; Botello-Álvarez, E.; Rico-Martínez, R.2003. Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. J. Agric. Food Chem.51, 2206, 2211.

CAPITULO 5. FERMENTACIÓN

5.1. DEFINICIÓN DE FERMENTACIÓN

²⁸Fermentación alcohólica. Denominada también como fermentación del etanol o fermentación etílica, es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras, mohos y algunas clases de bacterias, que producen cambios químicos en las sustancias orgánicas.

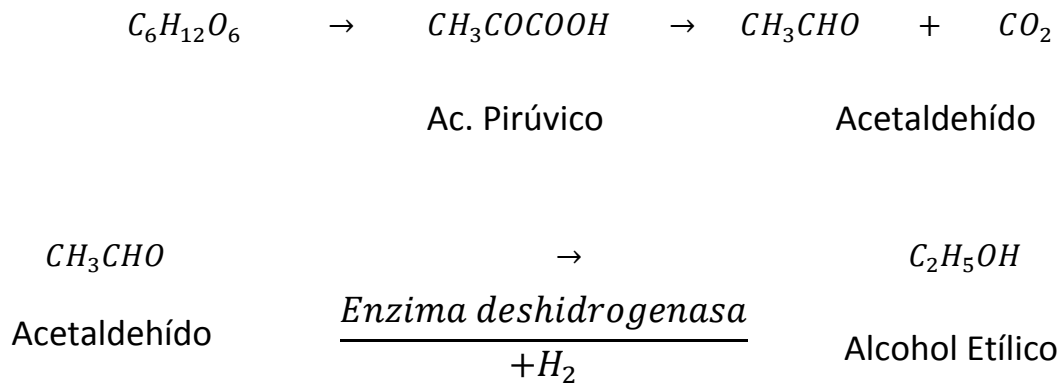
La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disociar las moléculas de glucosa y obtener la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO₂ como desechos de la fermentación.

CONDICIONES REQUERIDAS PARA LA FERMENTACION ALCOHOLICA

- Concentraciones de azúcares de 10-18%.
- pH entre 4.0 y 4.5
- Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*.
- Ausencia de O₂ y presencia de fosfatos
- Temperatura de fermentación: 15-25 °C, por encima de 50°C se evapora el alcohol.

El esquema general es como sigue: Un ejemplo muy claro es en la fermentación a partir de la glucosa y con la participación de diferentes enzimas, se origina el ácido pirúvico, el cual es descarboxilado hasta CO₂ y acetaldehído, este último por la acción de la deshidrogenación hasta alcohol etílico:

²⁸ Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. 18(6):559-561, 2002.



²⁹El oxígeno es el desencadenante inicial de la fermentación, ya que las levaduras lo van a necesitar en su fase de crecimiento. Sin embargo, al final de la fermentación conviene que la presencia de oxígeno sea pequeña para evitar la pérdida de etanol y la aparición en su lugar de ácido acético. La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor.

Es necesario controlar este aumento de temperatura ya que si esta asciende demasiado (25-30 °C) las levaduras comenzaran a morir deteniéndose el proceso fermentativo. Otro producto resultante de la fermentación es el anhídrido carbónico (CO₂) en estado gaseoso, lo que provoca el burbujeo, la ebullición y el aroma característico de una tina de fermentación.

Esta ebullición hace que las partes sólidas (hollejos) suban a la superficie del mosto formándose una capa en la parte superior del depósito llamado “sombbrero”. Esta capa, que dará origen al orujo, protege al mosto de ataques bacterianos y de posibles oxidaciones y, fundamentalmente, cede al mosto gran cantidad de sustancias contenidas en los hollejos. A lo largo de todo el proceso de fermentación, y en función de las condiciones (cantidad de azúcar disponible, temperatura,

²⁹ Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. 18(6):559-561, 2002.

³⁰oxígeno, etc.) cambia el tipo de levadura que predomina pudiéndose distinguir varias fases en la fermentación:

1. Primera Fase: Durante las primeras 24 horas, predominan levaduras no esporogéneas, que resisten un grado alcohólico 4-5. Son sensibles al anhídrido sulfuroso.
2. Segunda Fase: Segundo a Cuarto día, predomina el *Saccharomyces cerevisiae* que resiste hasta un grado de alcohol entre 8 y 16. En esta fase es cuando se da la máxima capacidad fermentativa.
3. Tercera Fase: Sigue actuando *Saccharomyces Cerevisiae* junto a *Saccharomyces Oviformis*. También pueden existir otros microorganismos procedentes principalmente de las bodegas y de los utensilios, suelen ser hongos entre los que destacan *Penicillium*, *Aspergillus*, *Oídium*.

OTRAS SUSTANCIAS GENERADAS EN LA FERMENTACIÓN

- Ácido Acético
- Ácido Láctico
- Ácido Pirúvico y Acetaldehído
- Acetoina, Diacetilo y 2-3 Butanodiol (Butilenglicol)
- Alcoholes Superiores, Esteres y Acetatos
- Vinil-Fenoles y Etil-Fenoles

USO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA

³⁰ Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. 18(6):559-561, 2002.

³¹El empleo principal de los procesos de fermentación por parte del ser humano ha ido dirigido, desde la antigüedad, a la producción de etanol destinado a la elaboración de bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza, el tequila y el mezcal. Dentro de los estudios de biotecnología se ha intentado emplear el etanol resultante de la fermentación alcohólica de los desechos agrícolas (biomasa) en la obtención de biocombustibles empleados en los motores de vehículos. Los usos del etanol en la industria son amplios y van desde la elaboración de productos cosméticos, productos de limpieza, etc. No obstante, el empleo de la fermentación alcohólica tiene un éxito potencial en el tratamiento de los residuos de la industria alimentaria. Un proceso industrial muy investigado a comienzos del siglo XXI es la fermentación en estado sólido empleada en la biomedicación y en la biodegradación de productos de desecho, la transformación biológica de residuos agroindustriales, en la producción de compuestos bioactivos, de enzimas, de ácidos orgánicos, biopesticidas, biocombustibles y compuestos aromáticos, entre otros.

5.2. FERMENTACIÓN ALCOHOLICA

La fermentación alcohólica, además de un proceso anaeróbico, es también un proceso exotérmico, es decir, libera energía, como moléculas de ATP de las cuales se genera un total de dos moléculas por cada molécula de glucosa procesada. Además, el valor de la entalpía libre o energía de Gibbs, en este tipo de fermentación, tiene un valor de $\Delta G = -234.6$ KJ/mol, lo que nos indica que se trata de un proceso químico de tipo espontáneo.

Existen diferentes tipos de fermentaciones alcohólicas, las cuales se dividen en dos grandes grupos: la fermentación industrial y la fermentación natural. Además, se puede hablar de una fermentación manipulada para obtener cierta cantidad de etanol en las bebidas.

³¹ Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. 18(6):559-561, 2002.

³²La fermentación consiste en la oxidación de los hidratos de carbono (azúcares) por parte de los microorganismos, la mayoría de los compuestos que determinan las propiedades organolépticas, se desarrollan en esta etapa.

Sánchez, (1989) en el estado de Oaxaca, la fermentación del agave previamente cocido y molido se realiza con el jugo cocido denominado bagazo. Haciendo distinguir dos tipos de fermentación:

- Fermentación Natural: Se realiza de manera diferenciada dependiendo de la o las variedades y la región donde se ubica los palenques. Donde se produce el mezcal Agave angustifolia, y sin adicionar ninguna sustancia, el tiempo de fermentación está en función de la temperatura ambiente, variado entre los 8 a 15 días.
- Fermentación Acelerada: La fermentación acelerada se logra adicionando sulfato de amonio (NH₄)-2SO₄. De manera general la fermentación se efectúa en tinajas de madera con capacidad aproximada de 2,000 litros cada una, las cuales son llenadas con agave molido hasta el 75% de su capacidad aproximadamente.

El proceso de fermentación comienza de manera espontánea las cepas que desencadenan la fermentación son nativas y se van reduciendo a medida que el tiempo avanza, el contenido de las tinajas se encuentra expuesto al medio ambiente. En los palenques existe un maestro mezcalero que conoce el momento exacto en el que se tiene que agregar agua hasta un 90% de su capacidad de la tina, para que se acelere el proceso de la fermentación.

Después de haber agregado agua, se deja reposar de 4-8 horas con la finalidad de que el agave molido se ablande, procedimiento después de revolver la tina por partes y de manera que se logre desmenuzar el agave insuficientemente molido y que el contenido sea uniforme. En la superficie de la tina se observan pequeños

³² Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. 18(6):559-561, 2002.

agujeros que se incrementan en número con el paso del tiempo. Por estos agujeros se desprende el dióxido de carbono producto de la fermentación, son tapados para conservar la temperatura ambiente y la calidad del agave.

El proceso de fermentación ha sido modificado en la actualidad por algunos de los productores al adicionarle sulfato de amonio como fuente adicional de nitrógeno, generalizando cada vez más esta práctica. El sulfato de amonio se adiciona en el fondo de la tina el día en que se deposita el agave molido, diluyendo en 200 litros de agua, aproximadamente se deja reposar por 1 o 2 días, al término de los cuales se revuelve, después de adicionarle en algunos casos 2 o 3 kg más.

5.3. PSIDIUM GUAJAVA L. (GUAYABA MANZANA)

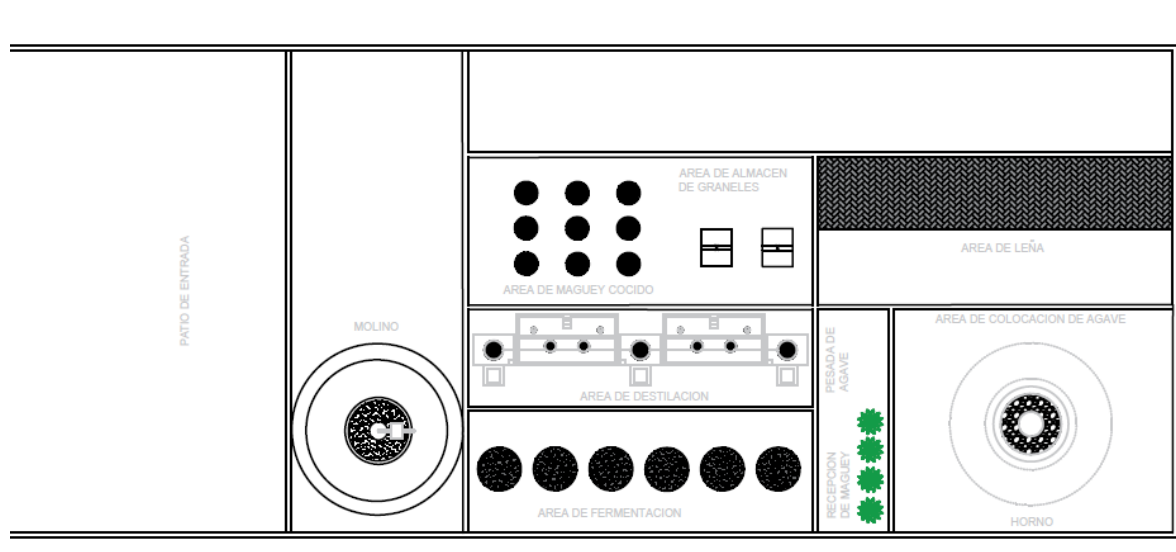
³³La planta de guayabo (*Psidium Guajava* Linneo), es una especie originaria del trópico y subtropico americano cuyo centro de dispersión va desde México hasta Brasil, dentro de los 35° latitud norte y 35° latitud sur. (Hutchinson, 1973; Medina et al., 1978).

El árbol de guayabo posee una altura que varía desde 3 a 10 m, la epidermis de los troncos y ramas maduras es lisa, delgada, de color castaño-rosado y provista de innumerables lentécelos o poros; también descama o muda cuando envejece (Hamilton & Seagrave-Smith, 1959). El guayabo se desarrolla bien desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm, con temperaturas entre 16 y 34°C, precipitación anual entre 1,000 y 1,800 mm y humedad relativa entre 36 y 96% (Gómez et al., 199, García, Lin & Chang, 2003). La planta posee una raíz principal, pivotante, con crecimiento inicial normalmente superior a las raíces secundarias y se desarrolla bien en varios suelos, desde arenosos hasta arcillosos. El árbol de guayabo es muy resistente a la salinidad, tolerando pH entre 4.5 y 8.2, comportándose mejor con pH entre 6.0 y 7.0. Asimismo, tolera periodos prolongados de sequía hasta 6 meses y crece sobre diferentes tipos de suelos.

³³ Bibek, R. y B. Arun. 2010. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª Ed. Editorial Mc Graw Hill. España. 376 pp.

³⁴Los frutos de guayaba proporcionan fibra dietaría y vitaminas antioxidantes asociadas con la disminución de lipoproteínas (Singh et al., 1992) y glucosa sanguínea (Yusof & Said, 2004), contienen polifenoles, estos son metabolitos secundarios que producen las plantas con actividad antioxidante beneficiosa para la salud humana (Instituto Nacional de Nutrición, 2001) y aminoácidos como lisina con un contenido de 24 mg/ 100 g de pulpa, 8 gr de triptófano como de metionina que contribuyen con el crecimiento del cerebro humano. El consumo de la guayaba reduce el estrés oxidativo y modifica el perfil lipídico, con el cual reduce el riesgo de enfermedades causadas por radicales libres y el elevado colesterol sanguíneo (Rahmatet et. al., 2004). También es reconocido el valor de la guayaba para reducir el colesterol HDL de la sangre, previene contra la tuberculosis y actúa como neutralizante de la acides de los hidratos de carbono. (Lee, 1992).

VISUALIZACIÓN DE UN PALENQUE EN MATATLAN, OAXACA



³⁴ Bibek, R. y B. Arun. 2010. Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. 4ª Ed. Editorial Mc Graw Hill. España. 376 pp.

CAPITULO 6. METODOLOGIA

6.1. MATERIALES

- 1 mechero Bunsen
- 1 probeta graduada de 250 ml
- 1 matraz de 50 ml graduado
- 2 asas de siembra para cultivo
- 4 cajas Petri estériles
- 1 soporte universal
- 1 tela de asbesto
- 1 agitador

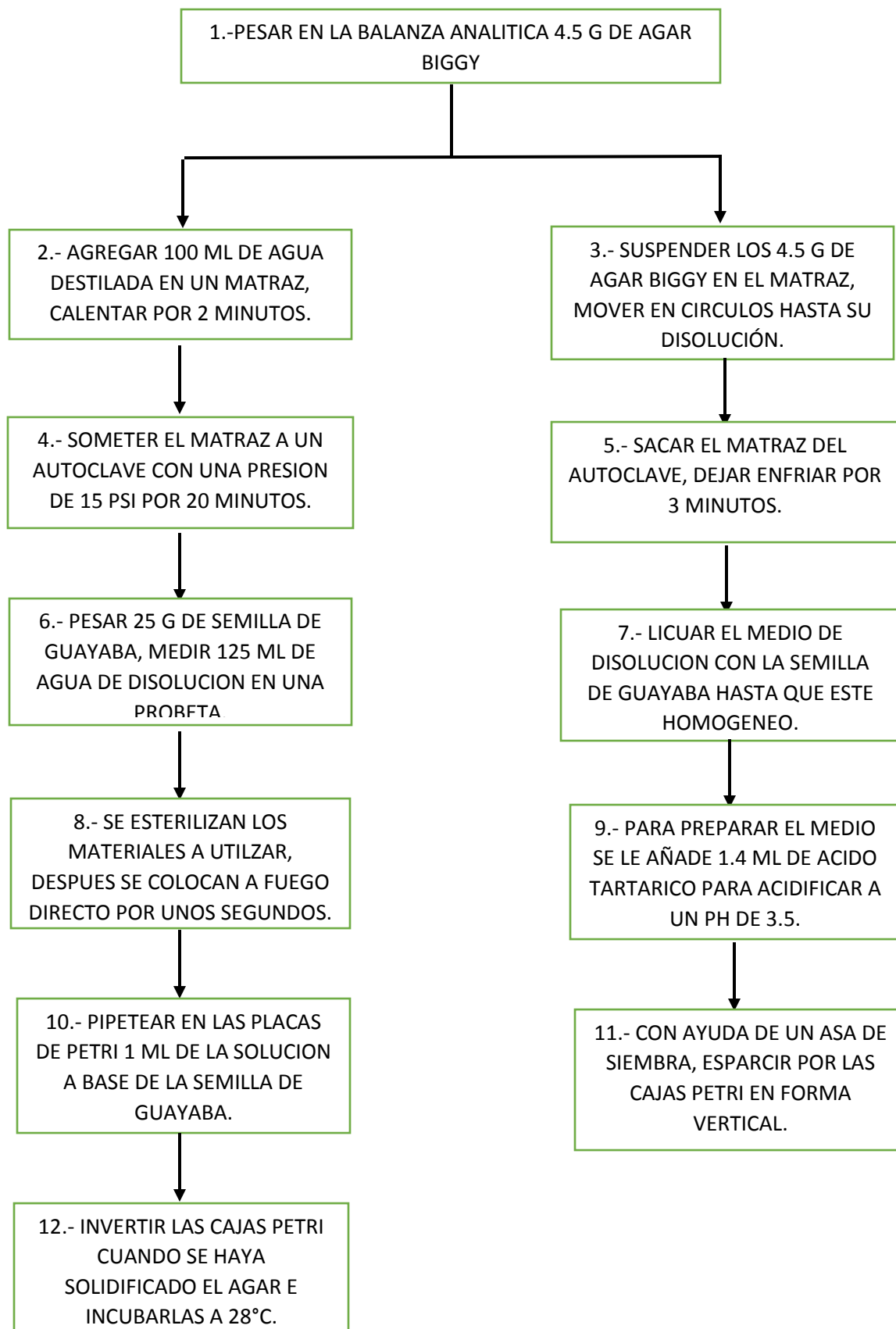
REACTIVOS

- Medio de cultivo Agar Biggy
- Agua destilada
- Semillas de guayaba
- Acido tartárico

EQUIPOS UTILIZADOS

- Olla exprés
- Balanza analítica
- 1 parrilla eléctrica

6.2. DIAGRAMA DE FLUJO



6.3. METODO PARA EXTRAER LAS SEMILLAS DE GUAYABA.

- 1.- Las guayabas a utilizar son de la especie guayaba de manzana que están de temporada, las caracteriza el color rojo en el interior y en base a investigaciones se comprueba que contiene mayor cantidad de semillas.
- 2.- Se lavan y se cortan en trozos pequeños la guayaba para extraer las semillas, se pasan mediante un colador para quitar el exceso de pulpa.
- 3.- Las semillas obtenidas se lavan y se someten a secar, para utilizar un horno el tiempo de secado debe ser menor a 1 minuto ya que la semillas no presenta mucha humedad, y de forma natural el secado tarda aproximadamente 2 días en su totalidad.
- 4.- Después de estar secas se tritura, se pesan y se almacenan para después ser utilizadas.

METODO PARA LA FERMENTACION EN LA TINA

- 1.- Se tuvo una cocción de 12,000 kg de agave de la especie Maguey Angustifolia, por 4 días en el horno de los cuales se tomó 3 kg para la realización de las pruebas.
- 2.- Se somete a esterilización el agave mediante autoclave a 75°C para la eliminación adicional de microorganismos presentes en el maguey.
- 3.- Se tritura el agave, y se agrega a la tina de fermentación junto con las semillas de guayaba, estas se agregan en el centro del mosto.
- 4.- En un vaso de precipitado se calienta 1 Lt de agua a una temperatura de 30°C para que se le adicione a la tina de fermentación.

METODO DEL MEDIO DE CULTIVO

Medio para el aislamiento y diferenciación de levaduras del género *Cándida*.

FORMULA PARA 1 LT DE AGUA PURIFICADA:

Citrato de amonio y Bismuto	5.0 g
Sulfito de Sodio	3.0 g
Dextrosa	10.0 g
Glicina	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar Bacteriológico	16.0 g

pH final: 6.8 ± 0.2

METODO DE PREPARACIÓN

- 1.- Suspender 4.5 g del medio en 100 ml de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta completa disolución del polvo y hervir durante 1 minuto.
- 2.- No sobrecalentar la solución.
- 3.- Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C, sellar el matraz con papel aluminio.
- 4.- Someter el medio a una presión de 15 psi en una olla exprés, por aproximadamente 20 minutos. Después de estar en la olla se pasa por agua a temperatura ambiente.
- 5.- Esperar a que la solución del medio este a temperatura ambiente y agregar a las cajas Petri, manteniendo cerca del mechero para evitar que se contaminen.

PREPARACION DEL MEDIO DE SIEMBRA

- 1.- Se pesa en una balanza analítica la cantidad de 25.0 g de semillas de guayaba.
- 2.- En la zona de cultivo, se prende el mechero bunsen y alrededor se colocan los materiales a utilizar.

3.- Se esteriliza los materiales, aplican alcohol y después colocarlas al fuego directo durante unos segundos.

4.- Se agregan los 25 g de la semilla de guayaba, en un recipiente donde después se va a licuar por aproximadamente 5 minutos hasta tener una mezcla homogénea.

5.- Se agregan 225 ml de disolución de caldo, para homogenizar la muestra.

6.- Para preparar el medio se le agrega 1.4 ml de ácido tartárico para acidificar a un pH de 3.5, al 10% por cada 100 ml de medio.

7.- Pipetear en placas de Petri con alícuotas de 1 ml de la solución a base de la semilla de guayaba. En este caso se realizan 4 pruebas en los medios de cultivo.

8.- Invertir las placas cuando se haya solidificado el agar e incubarlas a 20- 24 °C durante 3-5 días.

9.- Contar las colonias de cada placa después de 3 días seleccionar aquellas que contengan entre 10 y 150 colonias.

CALCULOS PARA ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

- Agar Biggy → Levaduras. Para la preparación de 100 ml, se utilizan 4 cajas Petri.

$$100 \text{ ml} * \left(\frac{45.0 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \right) = 4.5 \text{ g}$$

X= 4.5 gr a utilizar del medio.

Peso del vidrio del reloj: 50.4476 gr

Peso total: 54.9947 gr

Peso de las semillas de guayaba para el medio: 25.05 gr

PROCESAMIENTO DE RESULTADOS

Datos:

Edad de maduración del agave: 6 años

Kilogramos Totales de Cocción: 12,000 kg

Tiempo de Cocción: 4 días

No. de Piñas: 147 ART: 26%

Especie de Agave: Angustifolia

Tabla 1. Representación de datos obtenidos durante la realización de la prueba en la tina de fermentación.

G DE AGAVE COCIDO	G DE SEMILLA DE GUAYABA	G TOTALES	GR DE AGUA	MASA TOTAL
500	87.01	587.01	480	1067.01
1000	174.02	1174.02	1100	2274.02
1500	261.03	1761.03	1600	3361.03
2000	348.5	2348.5	1950	4298.5
2500	433.4	2933.4	2200	5133.4
3000	650	3650	3200	6850

Tabla 2. TIEMPO DE FERMENTACIÓN

Representa los días en la fermentación y las temperaturas obtenidas.

FERMENTACION	
DIAS	TEMPERATURA
0	27
1	27
2	27
3	28.5
4	28
5	28.8
6	28.9
7	29
8	29
9	29.5
10	29.8
11	30
12	30.8
13	30.9
14	31
15	31

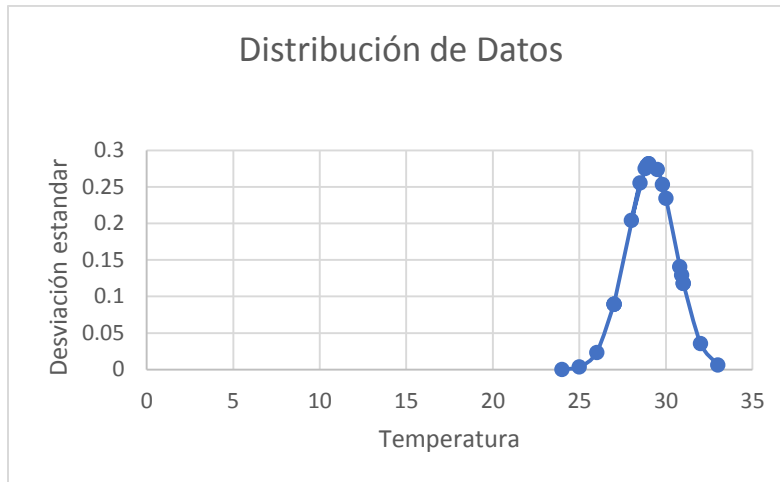
Con base a los datos se calcula la media y la desviación estándar, para la desviación estándar se calculan la muestral y la poblacional.

Con base a la fórmula de estadística:

$$x = \frac{\sqrt{\sum |x - \tilde{x}|^2}}{n}$$

Muestral: 29.1375 ± 1.4080

Poblacional: 29.1375 ± 1.3633



Grafica 1. Campana de Gauss, demuestra la distribución de los datos obtenidos con base a la temperatura.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- AGAR BIGGY PDA

Se realiza el recuento de los microorganismos presentes en la muestra del suelo, se selecciona las placas que mostraron un crecimiento de 10 a 150 colonias. Para visualizar mejor el crecimiento es conveniente ubicar la caja Petri en un aparato especializado, dividiendo la placa total en sectores cuadrículados.

Se aplica la siguiente formula:

$$\frac{UFC}{g} = N^{\circ} \text{ de colonias en placa} \times \text{inverso de la disolución} \times 10$$

$$10^{-4} = 6.56 \times 10^6 = 6,560,000 \frac{UFC}{ml}$$

Tabla 3. CARACTERISTICAS DE LAS LEVADURAS

COLONIA	FORMA	COLOR	TAMAÑO	APARIENCIA
A	Redonda	Beige	2 mm	Creмосa
B	Redonda	Beige	5 mm	Creмосa
C	Borde Irregular	Beige	4 mm	Creмосa
D	Redonda	Beige	1.5 mm	Creмосa

En esta tabla se presentan las características que están presentes en los cultivos realizados en las cajas Petri de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*, se describe la forma, color, tamaño y apariencia, de los 4 tipos de cultivo, los cuales se agregaron 0.100 ml de solución.

ANALISIS DE RESULTADOS

La fermentación es un proceso determinante en la composición final del producto en este caso la fermentación alcohólica, tiene como producto principal el etanol a partir de un mosto azucarado, en el proceso solo intervienen microorganismos para un buen resultado. Para llegar a estas condiciones se deben evaluar variables que corresponden a una buena temperatura, aireación, nutrientes estos son necesarios para el crecimiento microbiano. (Molina, 2014)

Para utilizar la semilla se realiza un proceso de secado y molido, luego del cual se evalúa como fuente de nitrógeno, en fermentación alcohólica, para obtener alcohol; y ácido láctico para obtener ácido láctico. (Serna Cock, 2013).

En términos de costo, teniendo como referente el uso de urea como sustrato convencional para las fermentaciones, este disminuye cerca del 30% para la fermentación alcohólica, y entre 70 % y 80 % para la fermentación ácido-láctica.

“Estas semillas aportan vitaminas adicionales que pueden contribuir al crecimiento de las levaduras y mejorar la producción y el rendimiento del alcohol”. La harina de semillas de guayaba es una fuente viable económica y ambientalmente, pues evita la contaminación generada por los residuos al ser desechados, y un valor agregado para los productores de ese sector de la industria. (Serna Cock, 2013).

El crecimiento de una levadura por lote se puede representar por medio de fases en las cuales cada fase representa una etapa para el crecimiento adecuado de las levaduras. En base a los datos obtenidos de la Tabla 3. Características de las levaduras que presentan los 4 tipos de cultivo y el calculo para el conteo final de las colonias formadas en los cultivos.

Además de la formación de etanol y de ácido láctico, durante la fermentación se forman compuestos secundarios, los cuales dan características particulares a la bebida, en la mayoría de las bebidas alcohólicas los compuestos responsables del olor y sabor son los alcoholes superiores (aldehídos, ésteres, furfural). (Santiago-Urbina, 2013).

El agave *Angustifolia* Haw presenta un ART: 26% lo que indica que durante el proceso de fermentación la formación de los azúcares será adecuada, con respecto a la Tabla 2. Tiempo de fermentación muestra las temperaturas obtenidas durante un tiempo de residencia de 15 días, las temperaturas se mantuvieron menores a 32°C para que el crecimiento de las levaduras fuera adecuado.

CONCLUSIÓN

Para implementar la harina de semilla de guayaba en una tina de producción de mezcal de 1,200 litros durante un periodo de producción normal, se recomienda utilizar 50 kg de harina de semilla y un tiempo de residencia de 4 días para que el mosto alcance condiciones favorables para la producción de azúcares en la fermentación y en la destilación sea mucho más eficaz al haber una mayor cantidad de alcohol.

Con base en las pruebas realizadas con la semilla de guayaba se puede demostrar que se obtuvieron resultados favorables, en la Tabla 3 se demuestra que la semilla de guayaba presenta buenas condiciones para el crecimiento de microorganismos en este caso de la levadura *Saccharomyces cerevecea* que esta presenta en dicha etapa de fermentación, presentando características similares a las antes estudiadas.

De acuerdo con la teoría “estas semillas aportan vitaminas adicionales que pueden contribuir al crecimiento de las levaduras y mejorar la producción y el rendimiento del alcohol”. (Serna Cock, 2013).

ANEXOS

3.5. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-070-SCFI-2016

La presente Norma Oficial Mexicana se refiere a la Denominación de Origen Mezcal, cuya titularidad corresponde al Estado Mexicano bajo los términos contenidos en la Ley de la Propiedad Industrial. La emisión de esta Norma Oficial Mexicana es necesaria de conformidad con el resolutivo segundo de la "Resolución mediante la cual se otorga la protección prevista a la denominación de origen Mezcal, para ser aplicada a la bebida alcohólica del mismo nombre, publicada el 28 de noviembre de 1994, así como sus modificaciones subsecuentes y con el artículo 40 fracciones I y XV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Objetivo

Esta Norma Oficial Mexicana establece las características y especificaciones que debe cumplir la bebida alcohólica destilada denominada Mezcal para su producción, envasado y comercialización.

Campo de aplicación

Esta Norma Oficial Mexicana aplica para la producción y envasado de Mezcal en toda el área geográfica comprendida en la Resolución, así como su comercialización en territorio nacional y producto de exportación.

Referencias normativas

Los siguientes documentos vigentes, o los que les sustituyan, son indispensables para la aplicación de esta Norma:

- ❖ NOM-030-SCFI-2006 Información comercial de cantidad en la etiqueta-Especificaciones, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de noviembre de 2006.

- ❖ NOM-142-SSA1/SCFI-2014 Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de marzo de 2015.
- ❖ NOM-251-SSA1-2009 Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de marzo de 2010.
- ❖ NMX-V-004-NORMEX-2013 Bebidas Alcohólicas- Determinación de Furfural-Métodos de Ensayo (Prueba). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de enero de 2014.

Categorías

De acuerdo con el proceso específico utilizado de cocción del maguey o agave, molienda, fermentación y destilación, se obtienen tres categorías de Mezcal (Ver Tabla 1):

Tabla 1-Categorías de Mezcal

Mezcal
Mezcal Artesanal
Mezcal Ancestral

Especificaciones fisicoquímicas

El Mezcal debe cumplir con las siguientes especificaciones (ver Tabla 2):

TABLA 2-Especificaciones fisicoquímicas

Especificaciones	Unidades	Mínimo	Máximo	Norma aplicable
Alcohol Volumen a 20 °C	% Alc. Vol.	35	55	NMX-V-013-NORMEX-2013 (Ver 2.6)
Extracto Seco	g/L de Mezcal	0	10	NMX-V-017-NORMEX-2014 (Ver 2.7)
Alcoholes Superiores	mg/100 mL de Alcohol anhidro	100	500	NMX-V-005-NORMEX-2013 (Ver 2.5)
Metanol	mg/100 mL de Alcohol anhidro	30	300	NMX-V-005-NORMEX-2013 (Ver 2.5)
Furfural	mg/100 mL de Alcohol anhidro	0	5	NMX-V-004-NORMEX-2013 (Ver 2.4)
Aldehídos	mg/100 mL de Alcohol anhidro	0	40	NMX-V-005-NORMEX-2013 (Ver 2.5)
Plomo (Pb)	mg/L	-	0,5	NMX-050-NORMEX-2010 (Ver 2.8)
Arsénico (As)	mg/L	-	0,5	NMX-050-NORMEX-2010 (Ver 2.8)

3.6. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-142-SSA1/SCFI-2014, BEBIDAS ALCOHÓLICAS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. ETIQUETADO SANITARIO Y COMERCIAL.

La presente Norma tiene por objeto establecer las especificaciones sanitarias y disposiciones de etiquetado sanitario y comercial de las bebidas alcohólicas que se comercialicen en el territorio nacional.

Esta Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican al proceso o importación de bebidas alcohólicas. Quedan exceptuados de su aplicación los productos para exportación.

Disposiciones y especificaciones sanitarias

Los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en la Ley, el Reglamento y las demás disposiciones jurídicas aplicables, deben sujetarse a lo siguiente:

En la elaboración de bebidas alcohólicas se debe cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana, citada en el punto 2.5, del Capítulo de Referencias, de esta Norma.

El agua empleada en la elaboración de bebidas alcohólicas debe ser para consumo humano y cumplir con lo señalado en la Norma Oficial Mexicana, citada en el punto 2.4, del Capítulo de Referencias, de esta Norma. De ser necesario podrá utilizarse agua destilada o desmineralizada.

Como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas, únicamente se permite el uso de alcohol etílico de origen vegetal cuyo contenido de productos secundarios no exceda las siguientes especificaciones:

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO mg/100ml de alcohol anhidro
Metanol	100,0
Aldehídos	30,0
Furfural	5,0
Alcoholes superiores	200,0

Las bebidas alcohólicas, a excepción de las fermentadas, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO Valores expresados en mg/ 100ml de alcohol anhidro
Metanol	300,0
Aldehídos	40,0
Furfural	5,0
Alcoholes superiores	500,0*

* El límite máximo de alcoholes superiores para el Whisky y el Cognac no debe exceder de 1000 mg/100 ml de alcohol anhidro.

Las bebidas alcohólicas fermentadas deben cumplir con las siguientes especificaciones:

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO mg/100 ml de alcohol anhidro
Metanol	300,0

Contaminación por metales pesados y metaloides.

Las bebidas alcohólicas deben cumplir con las siguientes especificaciones:

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO mg/l
Plomo (Pb)	0,5
Arsénico (As)	0,5

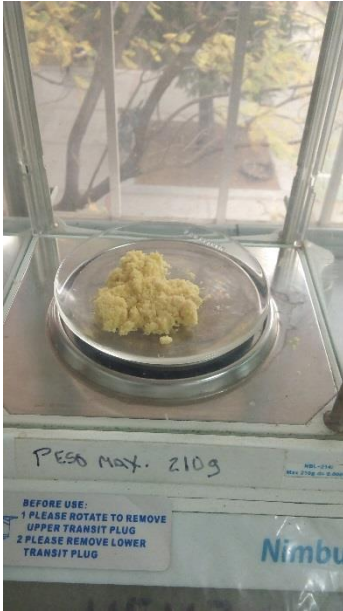
Las bebidas alcohólicas destiladas, deben provenir de mosto(s) de origen vegetal.

Bebidas con bajo contenido energético.

Para ser consideradas como bebidas alcohólicas con bajo contenido energético deben reducir el mismo, al menos en un 24% con relación al contenido energético de la bebida alcohólica original.

Ingredientes opcionales.

En la elaboración de los productos objeto de esta Norma se permite el empleo de ingredientes opcionales, tales como: laminilla de oro, variedades de chile, gusanos de agave, frutas, arbolito escarchado, hierbas, entre otros; siempre y cuando no representen un riesgo a la salud.



Peso del medio de cultivo Agar Biggy



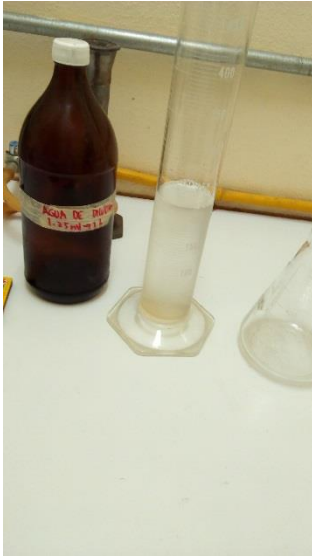
Calentar 100 ml de agua destilada por 1 minuto



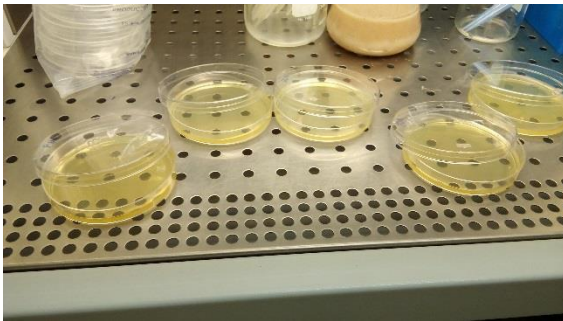
Disolución del medio de cultivo en los 100 ml de agua destilada.



Pesar 25 g de semilla de guayaba para realizar el medio de cultivo.



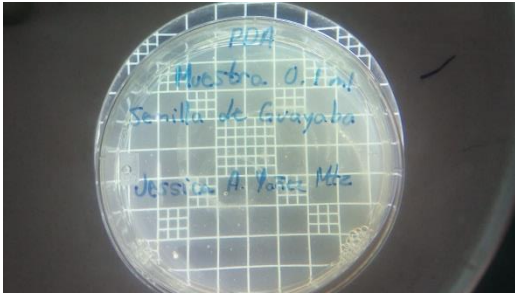
En una probeta medir la cantidad de agua de disolución 225 ml, para después licuar con las semillas de guayaba.



Preparación de las cajas Petri para después incubar la levadura.



Imagen de muestras de incubación de las levaduras.



Conteo de colonias en el medio de cultivo.



Conteo de colonias, en cada cuadrante se realiza un conteo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Ballesteros, M; Oliva, JM; Manzanares, P; Negro, MJ; Ballesteros, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World J Microbiol Biotechnology* 18(6):559-561, 2002.
2. Deeb, RA; Chu, KH; Shih, T; Linder, S; Suffer, IM; Kavanaugh, MC; Alvarez, CL. MTB and other oxygenates: Environmental sources, analysis, occurrence, and treatment. *Environm, Eng. Sci.*20(5):433-447, 2003.
3. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. www.cesaveg.org.mx
4. Nursten, H. *The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005
5. Francisco Ruiz Terán. Departamento de Alimentos y Biotecnología Fac. de Química Universidad Nacional. Autónoma de México. México D.F.04510, México. Fax: 56225309, e-mail: panchote@servidor.unam.mx
6. Navarrete-Bolaños, J.L.; Jiménez-Islas, H.; Botello-Álvarez, E.; Rico-Martínez, R. 2003. Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2206,2211.
7. "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas", H.J. Vázquez, *INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII.* 4. 249-259, 2007.
8. Verdugo, A. 2013. Caracterización de las levaduras asociadas al proceso fermentativo del mezcal. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de México. México. 159 pp.
9. Verdugo Valdez, A., Segura García, L., Kirchmayr, M., Ramírez Rodríguez, P., González Esquinca, A., Coria, R., Gschaedler Mathis, A. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100:497-506.
10. Verdugo, A. 2007. Dinámica de levaduras mediante técnicas microbiológicas y moleculares. *Lacandonia.* 1 (1): 29-35.

