

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUÍMICO

QUE PRESENTA:

MARCOS FRANCISCO HERNÁNDEZ ROBLES

CON EL TEMA:

**“DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS PARA LA
PREPARACIÓN DEL FERMENTADOR SEMILLA, EN EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA ELABORACIÓN
DE MEZCAL.”**

MEDIANTE:

OPCION X

(MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

OCTUBRE 2012



SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 12 DE JUNIO 2012

OFICIO NUM. DEP-CT-114/2012

C. MARCOS FRANCISCO HERNÁNDEZ ROBLES
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. M. en C. LUCÍA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO, ING. JAQUELINE LEYRA HERNÁNDEZ, QFB. AURA FLORES PÉREZ y DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI, en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

"DESARROLLO DE LOS PROTOCOLOS PARA LA PREPARACIÓN DEL FERMENTADOR SEMILLA, EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE MEZCAL"

Registrado mediante la opción:
X (MEMORIA DE RESIDENCIA PROFESIONAL)

ATENTAMENTE
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"

ING. ROBERTO CIFUENTES VILLAFUERTE
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Vo. Bo.

M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'RCV/L'ORC

Carretera Panamericana Km.1080, . C.P. 29050, Apartado Postal 599
Teléfonos: (961) 61 5-03-80 (961) 61 5-04-61 Fax: (961) 61 5-16-87
<http://www.ittg.edu.mx>



Alcance del Sistema: Proceso Educativo

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	4
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos específicos	7
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.....	8
5. PROBLEMAS A RESOLVER	10
6. ALCANCES Y LIMITACIONES	10
7. MARCO TEÓRICO	11
7.1 GENERALIDADES DEL MEZCAL	11
7.2 ESTADOS PRODUCTORES Y DENOMINACIÓN DE ORIGEN DEL MEZCAL	13
7.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL MEZCAL.....	16
7.4 <i>Agave salmiana</i>	19
7.4.1 Generalidades	19
7.4.2 Distribución geográfica	19
7.4.3 Principales carbohidratos	20
7.5 PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE MEZCAL	22
7.5.1 Recolección.....	22
7.5.2 Cocción	23
7.5.3 Molienda	24
7.5.4 Fermentación	25
7.5.4.1 Compuestos organolépticos	29
7.5.5 Destilación	30
7.5.6 Maduración	31
7.6 ESTANDARIZACIÓN DE PROCESOS	35
7.7 MEJORAMIENTO EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS	35
7.7.1 Monitoreo y control de biorreactores.....	35
7.7.2 Análisis de las medidas	37
7.7.3 Análisis en los fallos de funcionamiento	38

7.7.4	Cálculo del estado de proceso.....	39
7.8	CONTROL ESTADÍSTICO DE PROCESOS.....	39
7.8.1	Variabilidad	41
7.8.2	Gráficos de control	42
8.	PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES	48
8.1	Actividades desarrolladas en el proceso para la obtención del mezcal.....	48
8.2	Registro de actividades para la generación de inóculo	51
8.3	Registro de análisis y resultados en el monitoreo de la generación de inóculo	52
8.4	Análisis de la variabilidad de los parámetros de control.....	52
8.5	Análisis para la identificación de variables críticas de control	53
8.6	Elaboración de manuales.....	53
8.7	Variabilidad de la materia prima.....	53
9.	RESULTADOS	55
9.1	Actividades desarrolladas en la producción de inóculo	55
9.2	Registro de análisis y resultados para el monitoreo de la generación de inóculo	55
9.3	Análisis de la variabilidad de los parámetros de control.....	55
9.3.1	Determinación de los límites de control	59
9.4	Determinación de las variables críticas de control.....	60
9.5	Elaboración de manuales.....	61
9.6	Variabilidad de la materia prima.....	70
10.	CONCLUSIONES.....	71
11.	BIBLIOGRAFÍA	73
12.	ANEXOS.....	77
Anexo A.	Datos generados durante las etapas monitoreadas en la preparación del fermentador semilla.....	77
Anexo B.	Gráficas del comportamiento de las variables del proceso respecto a la variable crítica (contenido de alcohol) en fermentador de 1000L.	78
Anexo C.	NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.....	82

1. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México que se elabora de manera similar al tequila. No obstante la elaboración de tequila es un proceso más tecnificado, mientras que el mezcal tiene un proceso tradicional, esto provoca que la calidad del producto no sea uniforme y sea una limitante para su comercialización. El proceso comienza con la cosecha del agave después de 8 años de cultivo, en esta etapa son cortadas de su base y la mayor parte de las hojas son retiradas, obteniéndose las piñas de agave, las cuales son cocidas en hornos o autoclaves. En esta etapa los polisacáridos principalmente (fructanos), son hidrolizados térmicamente para obtener un jarabe rico en fructosa que, posteriormente se someten a una fermentación alcohólica con levaduras nativas o cepas seleccionadas, finalmente el mosto se destila con un contenido de alcohol 3-6% v/v, para obtener el mezcal blanco o joven (Cedeño,1995).

La denominación de origen mezcal; la cual comprende territorios protegidos en los estados de Durango, Guanajuato, Guerrero Oaxaca, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas; la NORMA OFICIAL MEXICANA DEL MEZCAL NOM-070-SCFI-94, el funcionamiento del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM A. C.) y el Patronato Nacional de la Industria del Mezcal A. C., aunado a la creciente presencia del mezcal en los mercados nacional e internacional y al buen prestigio que ha alcanzado el mezcal entre los consumidores finales, constituyen las bases para un vigoroso desarrollo futuro de esta actividad (Barragán, 2002).

La producción nacional de mezcal certificado se estima en mas de dos millones de litros, de los cuales 434 mil litros se exportan a estados unidos y a algunos países de Europa y de Asia, en el 2008 las exportaciones generaron ingresos por mas de 21 millones de dólares; beneficiando tan sólo en Oaxaca a más de 29 mil personas que dependen de la planta de agave para su sostenimiento. En nuestro país existen aproximadamente 200 especies de agaves de las que solo 30 son utilizadas para elaborar mezcal (Botello, 2009).

La empresa DYPICURIAN S.A de C.V. ha invertido más de 3 millones de pesos en la construcción de la planta piloto de biotecnología que se encuentra dentro de las Instalaciones del Instituto Tecnológico de Celaya, para evaluar el rendimiento de la producción de mezcal. La bebida producida por esta empresa llevará el nombre de “Sauco” para el mercado extranjero y el de “Arrebato 40” para el mercado nacional, los estudios preliminares han mostrado un buen rendimiento utilizando como materia prima el *Agave Salmiana*, que es producido en el municipio de San Felipe, Guanajuato. Se tiene pensado, posterior al estudio de optimización de la planta piloto, construir la planta industrial de mezcal en el municipio productor de agave contando para ello con aproximadamente 20 hectáreas, beneficiando a los productores de esta región que se dedican al cultivo del agave y dando empleo a más de 60 personas en planta, con una producción inicial estimada en 60 mil litros al año y expandiéndose de acuerdo a las necesidades del mercado a 210 mil litros al año (Cardona, 2011).

Desde hace pocos años un grupo de investigadores, pertenecientes al Instituto Tecnológico de Celaya en vinculo con la empresa DYPICURIAN S.A de C.V., interesados en optimizar y estandarizar el proceso para la elaboración de mezcal, teniendo como perspectiva la comercialización, han realizado varios estudios para cada una de las etapas principales: cocción, fermentación y destilación. En este trabajo se desarrolló un protocolo para la preparación estandarizada de un fermentador semilla. De manera conjunta se estudió la variabilidad que presenta la materia prima (piña de *Agave salmiana*), a lo largo de diferentes meses.

2. JUSTIFICACIÓN

El trabajo desarrollado en la planta piloto de DYPICURIAN S.A. De C.V. ubicada en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Celaya tiene como finalidad la implementación, validación e implantación de un protocolo para el proceso de producción de un fermentador semilla, que se empleará en la fermentación alcohólica de mosto de *Agave salmiana* cocido para la elaboración de mezcal.

La preparación de este cultivo iniciador es fundamental para que la fermentación se desarrolle en el tiempo y bajo los parámetros de rendimiento y calidad establecidos. Es entonces necesario llevar a cabo todas las actividades de la planta piloto con orden y reproducibilidad para mantener la variabilidad, debida a los errores humanos, dentro de límites de control permisibles. El estandarizar los resultados por medio de una metodología adecuada, brinda información importante que limita tanto el rango de valores de cada uno de las variables, así como de los parámetros de operación que deben seguirse.

Para desarrollar una producción dentro de los objetivos establecidos y que además sea eficiente, en cada una de las actividades que demandan los procesos y equipos, es indispensable que se encuentren registradas. Entonces factores como el olvido o cambio de personal no tendrán influencia en los resultados de las mediciones y en la calidad del producto final.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar y validar un protocolo para la preparación de un fermentador semilla, como etapa clave en la elaboración de mezcal a partir de *Agave salmiana*, que describa detalladamente los procedimientos involucrados, así como los parámetros de control que aseguren la producción de un inoculante con especificaciones dentro de un intervalo de variabilidad permitido.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar los diagramas de operación del proceso de producción en el fermentador semilla.
- Identificar la variabilidad de los parámetros de control que intervienen en el proceso de producción del fermentador semilla.
- Establecer las variables críticas de control para el desarrollo del protocolo de producción del fermentador semilla.
- Elaborar el manual de procedimientos para la producción del fermentador semilla y el de las técnicas empleadas en los análisis de las muestras.
- Estudiar la variabilidad de la piña de *Agave salmiana*, considerando las características de humedad y contenido de sólidos solubles en extracto crudo.

4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

Se trabajó en la planta piloto de la empresa DYPICURIAN S.A. de C.V., así como en el Laboratorio de Bioingeniería, ambas ubicadas en el ala este del edificio interdisciplinario del Instituto Tecnológico de Celaya; con dirección en Av. Tecnológico y Av. García Cubas, sin número; en la ciudad de Celaya, Guanajuato.

Actualmente, la empresa DYPICURIAN S.A de C.V. se encuentra bajo la dirección general del Ing. Raúl Castro Cervantes y del Ing. Josué Joaquín Grande Trejo como supervisor del área de producción; mientras que el Laboratorio de Bioingeniería está a cargo el Dr. José Luis Navarrete Bolaños.

En el laboratorio donde se realizó la residencia profesional, se encuentran las áreas para la preparación de inóculo, como son el área de siembra, que cuenta con una campana de flujo laminar con filtro de aire UV, materiales de limpieza, mecheros y asas microbiológicas.

El área de incubación para el crecimiento de las cepas, en esta área se encuentra una incubadora con regulación de temperatura, para el crecimiento de microorganismos en tubo, así como una incubadora con regulador de agitación y de temperatura para el crecimiento de los mismos en matraz; un área de trabajo general que cuenta con mesas, materiales de vidrio con diferente capacidad, refractómetros (digital y analógico), tubos para centrifuga, tubos Corning, potenciómetro, parrillas para calentamiento, espátulas, balanza analítica, biorreactores de diferente capacidad que cuentan con consola para el control de temperatura y agitación, refrigeradores para el mantenimiento de cepas, centrifuga, autoclave para esterilización de materiales y de cocimiento de piña de *Agave salmiana* (capacidad de 80 kg), secador de aire forzado y estante de almacenamiento de reactivos y medios de cultivo; el área de análisis instrumental tiene equipos como el espectroscopio de luz visible-UV, espectrofotómetro de masas y el cromatógrafo de gases. El área de microscopia que posee un microscopio electrónico y un microscopio fluorescente; por último el área de limpieza de materiales.

La planta piloto está ubicada en la parte posterior del laboratorio de Bioingeniería y en ella se encuentran los equipos necesarios para el procesamiento de la materia prima (cabezas de agave o piñas) , que tiene como fin la obtención de jugo de *Agave salmiana* cocido, para su fermentación, destilación y finalmente obtención del mezcal. Los equipos empleados son los siguientes: autoclave con capacidad de 700 Kg para el cocimiento de la piña, desgarradora para obtener en fibra la piña después del cocimiento, molino de rodillos para la extracción de jugo, criba para la filtración de la misma, biorreactor de 70 L para la fermentación semilla, fermentador de 1000 L para la producción de alcohol, bombas de desplazamiento positivo para la carga de jugo al fermentador y de mosto fermentado al destilador, torre de destilación de 9 platos con capacidad de destilar 400 L de mosto fermentado, tanques de almacenamiento para mezcal joven, barricas de roble blanco para el añejamiento y reposado del mismo.

Tanto el laboratorio de Bioingeniería como la planta piloto cuentan con servicio de gas, luz y agua, necesarios para los procesos de producción del fermentador semilla, cocimiento de piña, obtención de jugo y destilación. Todos los materiales y equipos del área de la planta piloto, así como del Laboratorio de Bioingeniería estuvieron disponibles.

5. PROBLEMAS A RESOLVER

Con el proyecto a realizar, en el área de producción, se pretende estandarizar el proceso de fermentación, mediante la identificación y monitoreo eficientemente de las variables de control en las etapas de obtención de inóculo, enfocando el trabajo de residencias hacia el ajuste de los errores humanos más comunes, que generan una alta variabilidad en los datos de muestreo, generando para ello manuales de procedimientos.

A fin de mejorar el rendimiento del proceso fermentativo, se espera aportar información con respecto a la variabilidad de la piña de *Agave salmiana*, determinando su contenido de sólidos solubles y porcentaje de humedad a lo largo del año, para así establecer el periodo en el que se puede obtener mejores rendimientos en la cantidad de azúcares presentes en la piña de agave.

6. ALCANCE Y LIMITACIONES

Dentro de los alcances de este trabajo de residencia, fue la evaluación del comportamiento del inóculo generado en las distintas corridas, teniendo en cuenta la repetitividad del proceso. Los datos obtenidos dieron lugar al análisis que permitiera establecer las variables críticas de control y los límites de variabilidad permisibles, además de realizar manuales de procedimientos, toma y análisis de muestra de la producción del inóculo iniciador.

Se logró recopilar información preliminar de la caracterización de la piña de *Agave salmiana*, ésta información se complementará con los análisis que se realicen a lo largo de todo el año, a fin de establecer el periodo en que se obtiene mayor concentración de sólidos solubles y se mejore el rendimiento de jugo.

Se debe considerar como limitante del trabajo el tiempo de la estancia, ya que para determinar de manera fehaciente los rangos y variables críticas de control del proceso, así como el periodo de cosecha de piña, se requiere de un mayor número de datos, en las que el análisis estadístico permita dar resultados más confiables.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 GENERALIDADES DEL MEZCAL

La palabra mezcal se deriva de la palabra náhuatl “mexcalli” que significa agave cocido en horno. El mezcal, según la NOM-070-SCFI-1994, es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados, directa y originalmente, con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de las siguientes especies de agaves: *Agave potatorum* Zucc, *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperrima* Jacobi, *Agave weberi* Cela, *Agave salmiana* Otto y otras especies, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras denominaciones de origen dentro del estado. Cada una de las cuales se someten a una hidrólisis o cocción, y posteriormente a una fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de efectuarse un enriquecimiento hasta con 20% de otros carbohidratos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le confieren las características a este producto (Jiménez 2009).

De acuerdo a sus características organolépticas se describe al mezcal como un líquido de olor y sabor sui géneris, estos atributos sensoriales varían de acuerdo a los tipos de agaves utilizados y al proceso de elaboración. El mezcal puede ser incoloro o ligeramente amarillo cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboca sin reposarlo o añejarlo. Es decir, un factor que influye en su sabor es el tiempo de maduración después de la destilación (Jiménez 2009).

Mientras que, de acuerdo a los carbohidratos empleados para su elaboración, el mezcal se clasifica en tipo I ó 100 % agave, el cual es elaborado exclusivamente con azúcares procedentes del agave y en tipo II, al que se le adicionan hasta un 20 % de carbohidratos que no son de agave. El mezcal tiene 3 presentaciones el mezcal joven obtenido de la destilación sin abocar, el mezcal reposado obtenido después de dejarlo reposar por lo menos durante 2 meses en barricas de encino o roble blanco y el mezcal añejo obtenido después de dejarlo reposar en barricas de encino o roble blanco por lo menos durante 1 año (NOM-070-SCFI-1994).

A diferencia del tequila que se produce en una región más reducida a partir de la especie *Agave tequilana* (NOM-006-SCFI-1994), el mezcal se elabora con diversas especies de agaves distribuidas en una área más amplia. Otra diferencia importante entre estas dos bebidas alcohólicas es que el tequila tiene un proceso más tecnificado y el mezcal generalmente tiene un proceso artesanal. Todo esto agrega un factor de variabilidad en la elaboración de mezcal de una región a otra.

La calidad del mezcal no solamente se basa en el cumplimiento de las especificaciones de las normas oficiales vigentes, debido a que también se debe considerar algunos factores subjetivos, entre ellos, la más importante es la aceptación del consumidor en función de las características sensoriales que percibe, las cuales están asociadas a la composición del producto.(Molina *et al.*, 2007). Estas características sensoriales se las proporciona diferentes grupos funcionales como los aldehídos, cetonas, esterés, ácidos, furanos, entre otros. (Jiménez, 2009). En el cuadro 7.1 se muestran algunos de los 85 compuestos volátiles que otorgan las características de aroma y sabor al mezcal joven.

Cuadro. 7.1. Compuestos identificados en mezcales jóvenes. (Molina *et al.*, 2007)

Compuesto	Grupo	Nota aromática
Dietil acetal	Acetal	Frutal
1,3-dietoxi propan 1-ol	Acetal	Frutal
1,1-dietoxipentano	Acetal	Frutal
Ácido Acético	Ácido	Vinagre
Ácido propanoico	Ácido	Frutal, acido
Ácido butanoico	Ácido	Frutal, fenólico
1-Butanol	Alcohol	Dulce
1-Hexanol	Alcohol	Pasto verde
3-metilbut-2-en-1-ol	Alcohol	Herbal
2-butanona	Cetona	-
3-hidroxi-2-butanona	Cetona	-

7.2 ESTADOS PRODUCTORES Y DENOMINACIÓN DE ORIGEN DEL MEZCAL

La denominación de origen del mezcal fue registrada el 9 de marzo de 1995 por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), con sede en Ginebra, Suiza, y gestionada por el Instituto de la Propiedad Industrial del gobierno federal a petición de los productores de mezcal y del gobierno del estado de Oaxaca, representado por la Secretaría de Desarrollo Industrial y Comercial (Arancibia,2012). La denominación de origen protege a la región comprendida de los estados de Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango. Posteriormente el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial otorga la denominación a los municipios de San Felipe en Guanajuato a partir de 2001 (Cabiedes, 2008).

El sistema-producto, Maguey – Mezcal, a nivel Nacional, involucra a 7 entidades federativas consideradas en la Denominación de origen mezcal: Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Guanajuato y Tamaulipas; entre éstas, destaca Oaxaca por la importancia que tiene su inventario magueyero, por su extenso padrón de productores de maguey y de mezcal, por sus altos volúmenes de producción y envasado de mezcal, y por la presencia del mezcal en los mercados regional, nacional e internacional. Oaxaca ocupa el 65% del mercado nacional y el resto está repartido en los demás estados.

Para el año 2004 el consejo mexicano para la regulación del mezcal estimó el número de fábricas y envasadores de mezcal como se detalla en el cuadro 7. 2, donde se indica la producción estimada anual por Estado con denominación de origen. Oaxaca ocupa el primer lugar en volumen de producción y en segundo lugar está Zacatecas. Para el año 2007 la situación ha cambiado debido a que la abundancia de agave motiva la inversión en nueva infraestructura para elaborar mezcal y aunque persisten los palenques y vinatas en Oaxaca, Durango y Guerrero, como la forma tradicional de elaborar mezcal, cada vez se incrementa el número de fábricas con equipos de acero inoxidable (Morales *et al.*, 2007).

Cuadro 7.2 Producción de mezcal por estado (Morales *et al.*, 2007).

Estados	Productores de mezcal	Envasadores	Litros producidos/año
Durango	50	10	360 000
Guerrero	180	3	800 000
Guanajuato	1	1	60,000
Oaxaca	380	55	2,500,000
San Luis Potosí	3	3	400 000
Tamaulipas	3	2	120,000
Zacatecas	8	6	1,500,000
Total	625	80	5,720,000

El órgano regulador del mezcal es el Consejo Mexicano Regulador de Mezcal (COMERCAM). Las actividades del COMERCAM inician con el Registro de Predios con Plantaciones de Agave, y la certificación para fábrica de producción y por lote en caso de producto envasado para comercialización nacional y extranjera, vigilando las especificaciones de la norma oficial NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal, además de las siguientes normas:

1. Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

Esta norma establece las buenas practicas de higiene y sanidad que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, para reducir significativamente intoxicaciones a la población consumidora , lo mismo que las perdidas de producto, al protegerlo contra contaminaciones contribuyendo a crearle una imagen de calidad.

Esta norma incluye requisitos necesarios para ser aplicados en los establecimientos dedicados a la obtención, elaboración y fabricación, mezclado, acondicionamiento, envasado, conservación, manipulación y transporte a fin de reducir los riesgos a la salud de la población consumidora. Estos requisitos abarca desde las disposiciones del

personal involucrado en el proceso, las instalaciones físicas del establecimiento, las instalaciones sanitarias, los servicios a planta, equipamiento, control de plagas, limpieza y desinfección de los equipos.

2. Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995, Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

Esta norma establece las especificaciones sanitarias y disposiciones de etiquetado y comercial de las bebidas alcohólicas que se comercialicen en territorio nacional.

En las especificaciones sanitarias permite únicamente el uso de alcohol etílico, para elaborar bebidas alcohólicas, cuyo contenido de productos secundarios no exceda las siguientes especificaciones:

Compuesto	Limite máximo
Metanol	100 mg/100 ml
Aldehído	30 mg/100 ml
Furfural	4 mg/100 ml
Alcoholes superiores	200 mg/100 ml

En el etiquetado del producto deberán figurar los requisitos de nombre o marca comercial del producto, nombre o denominación genérica del producto, indicación de la cantidad de producto, nombre, denominación o razón social y domicilio fiscal del importador, colocar el contenido de alcohol en % Alc. Vol, identificación del lote y tener la leyenda precautoria “El abuso en el consumo de este producto es nocivo para la salud”.

3. Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI-2006, Información Comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones.

Esta norma establece la ubicación y dimensiones del dato cuantitativo referente a la declaración de cantidad, así como las unidades de medida que deben emplearse conforme al Sistema General de Unidades de Medida y las leyendas: contenido, contenido neto y masa

drenada, según se requiera en los productos preenvasados que se comercializan en territorio nacional.

Esta norma establece considerar como superficie principal de exhibición el 40% del resultado de multiplicar el alto del envase, sin considerar hombros y cuello de la botella, por el perímetro de mayor circunferencia. Además, indica que las leyendas de CONTENIDO en el caso de bebidas deben ir seguidas del dato cuantitativo y de la unidad (L).

7.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL MEZCAL

La gran diversidad de agaves que existen en nuestro país ha hecho posible, en la mayoría de los estados, la generación de ingresos económicos para muchas familias que se dedican al cultivo y procesamiento del agave. En Oaxaca unas 29 mil 192 personas dependen de la planta de agave para su sostenimiento, usando las piñas para la elaboración de mezcal (Barragán, 2002).

De acuerdo al cuadro 7.3, la producción nacional de mezcal del año 1994 al 2000 aumentó de 2,875,000 a 8,400,000 litros. Durante este mismo periodo el comportamiento en el consumo nacional disminuyó hasta un 44% de la producción total, pero con aumento en las exportaciones en un 56% de la producción total.

Cuadro 7.3 Consumo nacional aparente de mezcal (Barragán, 2002).

Año	Producción nacional	Exportaciones	Consumo nacional
1994	2 875 000	637 000	2 238 000
1995	4 109 820	1 112 000	2 997 594
1996	5 875 000	1 860 000	4 015 000
1997	7 220 000	3 280 000	3 940 000
1998	8 500 000	4 000 000	4 500 000
1999	9 000 000	4 700 000	4 300 000
2000	8 400 000	4 700 000	3 700 000

Actualmente el mezcal se exporta a 29 países de América, Europa y Asia, mostradas en el cuadro 7.4.

Cuadro 7.4 Destino de las exportaciones de mezcal (Barragán, 2002).

América	Europa	Asia
Argentina	Alemania	China
Bolivia	España	Japón
Canadá	Francia	Taiwán
Colombia	Grecia	Turquía
Chile	Italia	
Ecuador	Países Bajos	
EUA	Portugal	

La gran demanda de mezcal en el mercado extranjero generó que los precios de exportación aumentaran del año 1994 al 2000, el comportamiento de los precios se aprecian en el cuadro 7.5.

Cuadro 7.5 Precio de exportación en dólares (Barragán, 2002).

Año	Exportaciones de mezcal (litros)	Ventas de exportación (miles de \$ USD)	Precio promedio de exportación (\$ USD por litro)
1994	637 000	1 274 000	2
1995	1 112 000	2 666 256	2.5
1996	1 860 000	5 580 000	3
1997	3 280 000	11 480 000	3.5
1998	4 000 000	16 000 000	4
1999	4 700 000	23 500 000	5
2000	4 700 000	79 900 000	17

La creciente demanda de mezcal ha traído como consecuencia el aumento en la demanda de agave, incrementando su precio; en 1994 una tonelada de agave costaba 40 dólares y para 2000 su precio se había disparado significativamente al cotizarse en 440 dólares la tonelada (Morales *et al.*, 2007), tal y como se observa en el cuadro 7.6. Obviamente, mayores requerimientos de agave para producir más mezcal se tradujeron en un aumento de

la superficie cultivada: 4 mil 840 hectáreas en 1994 a 10 mil en 2002, es decir, durante el periodo mencionado la superficie cultivada de agave aumentó a una tasa promedio interanual del 9.49 por ciento (Barragán, 2002).

En 2010 se registró una producción nacional de 1 246 790.13 toneladas de agave , Guanajuato ocupó el tercer lugar nacional con 93 166 toneladas de este cultivo., (INEGI,2011).

Cuadro 7.6 Precios del agave (Morales *et al.*, 2007).

Año	Precio por tonelada de agave	Precio por tonelada en
1994	40	135.6
1995	34	221
1996	85	552.5
1997	90	715.5
1998	100	924
1999	120	1 147.2
2000	440	4 166.8

Lo anterior ha dado como resultado que la iniciativa privada invierta en este mercado, generando empleos y beneficiando a los productores de agave, sobre todo en regiones de nuestro país donde el grado de pobreza y marginación son altos, los grados de marginación en los estados productores de mezcal se muestran en el cuadro 7.7.

Cuadro 7.7 Niveles de marginación en estados con denominación de mezcal (CONAPO, 2011).

Entidad productora de mezcal	Grado de marginación	Lugar de marginación
Oaxaca	Muy alto	3
Zacatecas	Medio	13
Guerrero	Muy alto	1
Durango	Medio	15
San Luis Potosí	Alto	7
Tamaulipas	Bajo	25
Guanajuato	Medio	14

7.4 *Agave salmiana*

7.4.1 Generalidades

El *Agave salmiana* Otto (Figura 7.1) ha sido cultivado por más de 5000 años, y muchas de sus características probablemente han sido moldeadas por esta larga asociación con el hombre (Martínez del Río y Eguiarte, 1987). Pertenece al subgénero *Agave* y se encuentra dentro del grupo *Salmianae*, que tiene un número total de cinco especies, de las cuales tres son endémicas de nuestro país (García y Galván, 1995). En condiciones de cultivo, alcanzan la edad reproductiva alrededor de los ocho años (Eguiarte *et al.*, 2000), es una especie robusta, monocotiledónea, mediana a grande, forma rosetas macizas de 1.5 a 2 m de alto; sus hojas son carnosas y macizas, de adultas se curvan hacia el suelo, presentan una espina terminal pungente de 5 a 8.5 cm de largo y con abundantes espinas laterales; el periodo de floración de *A. salmiana* ocurre desde el final de la época seca hasta el comienzo de la época lluviosa, a partir del mes de Mayo hasta Julio (Vargas, 2009).



Figura 7.1 *Agave salmiana*

7.4.2 Distribución geográfica

El *Agave salmiana* se puede encontrar en el área central de México, principalmente en los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Figura 7.2). Es el principal agave en Guanajuato para la producción de agave, esta planta prospera entre los 1000 a 2250 msnm, en climas que van de semiseco a seco con una precipitación pluvial de 320 a 720 mm anuales. El régimen térmico puede ser templado a semicálido extremo y la temperatura promedio anual puede ser de 16 a 22°C, las temperaturas mínimas hasta -12°C. Puede crecer en pisos de valles rocosos, laderas de

cerro, bajadas o abanicos aluviales, excepto en lugares propensos a inundaciones o con problemas de sales o sodio en el suelo (Vargas, 2009).



Figura 7.2 Distribución geográfica de los principales agaves en la República Mexicana (Vargas, 2009).

7.4.3 Principales carbohidratos

El principal carbohidrato de reserva de las plantas del genero agave es la inulina (fig. 7.3), un polisacárido que después de ser sometida a una hidrolisis térmica libera fructosa y glucosa, estos son los principales azúcares utilizados por los microorganismos para la producción de alcohol. El contenido de carbohidratos en los jugos de maguey determina el rendimiento y la calidad del producto terminado, lo cual puede depender de factores como el estado de madurez y condiciones de la hidrolisis térmica.

La inulina es un polímero lineal y esta compuesta de cadenas de 25 a 35 residuos de fructosa unidos por enlaces glucosídicos $\beta(2\rightarrow1)$ y termina con una molécula de sacarosa (Bautista *et al.*, 2001). En los magueyes, la inulina se sintetiza y almacena en el tallo, durante su prolongado periodo vegetativo; al comenzar el periodo de reproducción, la formación y sostenimiento de las enormes estructuras reproductoras significa una gran demanda de energía, la cual proviene de la fructosa y glucosa, resultantes de la inulina hidrolizada mediante la exoinulinasa. Además de inulina, en el *Agave salmiana* existe la presencia de otros azúcares como xilosa, fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.

Por su alto contenido de carbohidratos de reserva, el maguey maduro es aprovechado como materia prima en la producción de mezcal. En las fabricas se utilizan únicamente las piñas o cabezas de maguey, estructuras formadas por el tallo y la base de las pencas; el resto de la planta se desecha en el campo. Después de someter al maguey a una hidrolisis térmica, la concentración de fructosa aumenta considerablemente en comparación con la concentración en jugos crudos, mientras que la concentración de glucosa aumenta ligeramente, pues la inulina además de fructosa, contiene dos unidades de glucosa por molécula (Michel, 2007).

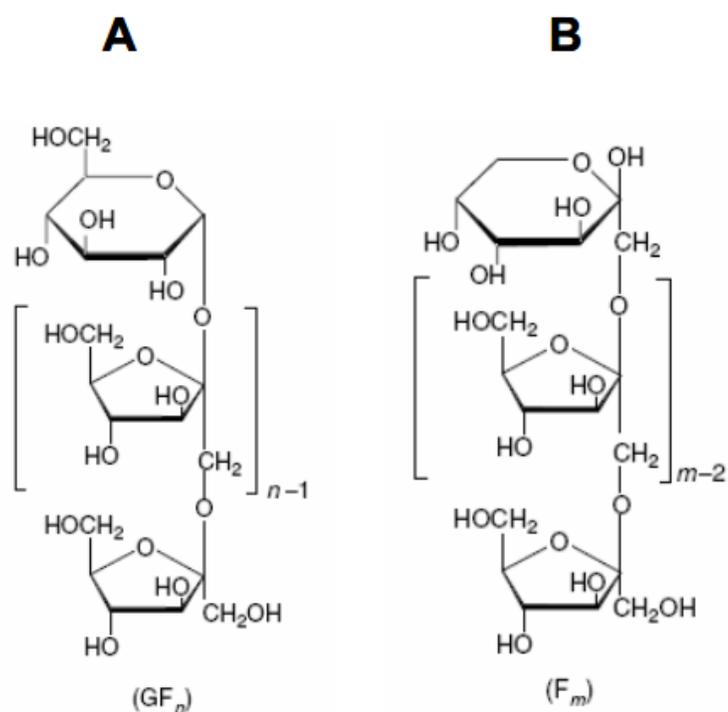


Figura 7.3 Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) (B). (Franck, 2006).

7.5 PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE MEZCAL

El proceso de elaboración del mezcal se realiza mediante el proceso artesanal sin tener control en la calidad del producto, por lo que esto ha sido una limitante para los productores de mezcal que no pueden certificar el producto ante la Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), dejando la oportunidad de colocar su producto en el mercado nacional e internacional, por ello es importante que exista una producción tecnificada para tener una misma calidad en el producto.

7.5.1 Recolección

La recolección de la materia prima (maguey o agave) es realizada por los agaveros o jimadores quienes conocen cuando se debe realizar el corte del agave, es decir; cuando la piña haya alcanzado la madurez fisiológica, esto es cuando el agave presenta coloración verde-amarillenta en la base de las pencas y parda en la base del maguey, así como la presencia de pencas secas en la base de esta zona. Desde el punto de vista bioquímico, el estado de madurez apropiado lo marca un alto contenido de azúcares que puedan ser aprovechados por los microorganismos para la generación de alcohol

La recolección del agave implica, además del corte de la piña, el rasurado que es la eliminación de las hojas o pencas (figura 7.4) (Ramales y Ortiz, 2006).



Figura 7.4 Rasurado del agave

La materia prima es la condicionante más importante a estandarizar en cualquier ámbito industrial debido a su importancia para obtener un producto con características de calidad

apreciado por la sociedad. En la producción de mezcal, la planta de agave o maguey se deja crecer durante un periodo de 6 a 10 años (dependiendo de las condiciones climáticas y del tipo de suelo), tiempo en el que alcanza una concentración de azúcares reductores de entre 20 a 30% en peso. Cuando un agave tiene un contenido de azúcares reductores del 20 %, es considerado de baja calidad y si presenta entre el 25 y 30% es de buena calidad (Téllez, 1998).

7.5.2 Cocción

La cocción se lleva a cabo para hidrolizar o transformar los fructanos en fructosa, monosacáridos apropiados 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 como se observa en la figura 7.5 (Ramales y Ortiz, 2006).

El proceso de cocción del agave en autoclave (figura 7.6) se realiza una vez llenada esta con trozos de piña de agave, se cierra la autoclave para iniciar con el suministro de vapor, proveniente de una caldera, a una presión de 1.2 Kg/cm^2 , con tiempo aproximado de 8 horas a una temperatura de vapor de $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Tres horas después de haber iniciado la cocción se drenan las mieles amargas durante una hora. Transcurrida las ocho horas se abre una válvula de esfera para liberar la presión interna del autoclave, después de 12 horas la temperatura del autoclave disminuye hasta $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y se procede a abrir para descargar el agave cocido (Morales, 2008).



Figura 7.5 Cocción tradicional de piñas



Figura 7.6 Cocción de piñas en autoclave

Durante el transcurso del cocimiento, y gracias a las condiciones de humedad, temperatura, tiempo y pH bajos se llevan a cabo una serie de reacciones que traen como consecuencia la formación de productos de Maillard (Mancilla y López, 1999) y posteriormente la caramelización de azúcares si el periodo de exposición es prolongado. Cabe mencionar que estos compuestos contribuyen al aroma y sabor del producto terminado. Se han encontrado alrededor de 240 productos de Maillard en extractos de agave cocido de *A. tequilana weber* variedad azul, algunos de estos compuestos se mencionan en el cuadro 7.8. En la literatura existe escasa información referente a la composición del *Agave salmiana*, la mayoría de los reportes están relacionados con el tequila y otras bebidas alcohólicas (Molina *et al.*, 2007). Actualmente se han realizado esfuerzos para la determinación de los diferentes compuestos generados en la cocción, que dan las características organolépticas del mezcal, esto a su vez depende del tipo de agave que se utilice para su elaboración, ya que existe una amplia variedad de agaves que son utilizadas para la fabricación de ésta bebida.

Cuadro 7.8 Compuestos de Millard generados durante el cocimiento de agave.

Furanos	Furanonas	Piranos
Tetrahidro-2-metilfurfural	dihidro-2-metil-3-furanona	2,3-dihidro-4-piran-4-ona
5-metilfurfural	dihidro-5-metil-2-furanona	2,3-dihidrox-3,5-dihidro-6-metil-4-piran-4-ona
2-furanmetanol	3-metil-2-furanona	2,3-dihidro-2-metil-4-piran-4-ona

7.5.3 Molienda

La trituración tiene como finalidad hacer que los monosacáridos obtenidos en la cocción sean más disponibles a la acción microbiana, así como a la captación de microorganismos del medio para favorecer la fermentación. El triturado se lleva a cabo generalmente utilizando un molino conocido como “molino egipcio” (Fig. 7.7). Este se conforma de una rueda de aproximadamente 500 kg de peso unida a un eje y que es tirada por un caballo (Ramales y Ortiz, 2006). Aunque también se pueden realizar mediante molinos industriales de rodillos como se aprecia en la Fig. 7.8, que extraen los jugos que salen por vía separada

de las fibras, los jugos se conducen a una fosa de líquidos previamente colados y se recircula en intercambiadores de calor para disminuir su temperatura de 50 a 25°C aproximadamente (Morales, 2008). Además se utilizan como complemento para facilitar la molienda, los desgarradores y rodillos mecánicos o combinación de molienda y extracción con agua caliente. Todos ellos permiten que el fluido se drene del material fibroso, obteniendo el jugo o licor que es la base del sustrato a fermentar. Además, se obtiene un subproducto llamado bagazo, que representa cerca del 40% total del agave molido sobre base húmeda y composición promedio (peso seco) de celulosa 43%, hemicelulosa 19%, lignina 15%, nitrógeno total 3%, pectinas 1%, azúcares residuales 10% y otros compuestos 9% (Cedeño, 1995).



Figura 7.7 Molino egipcio



Figura 7.8 Molino de rodillos

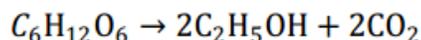
7.5.4 Fermentación

El etanol o alcohol etílico (C_2H_5OH), se ha producido en grandes cantidades por siglos y ha sido asociado a las bebidas alcohólicas. El empleo de levaduras para producir bebidas alcohólicas es un proceso muy antiguo. La mayoría de los jugos de frutas se fermentan por la acción de levaduras silvestres que están presentes en la fruta. De estas fermentaciones naturales, se han aislado algunas levaduras y debido a esto la producción de bebidas alcohólicas es una gran industria en todo el mundo (Madigan *et al.*, 1997).

La fermentación es un proceso biológico anaeróbico donde los azúcares simples, como la glucosa y fructosa, son transformados en etanol y dióxido de carbono por acción de las levaduras (Voet, 1995). Las levaduras son microorganismos eucariontes que cuando se encuentran en un medio rico de azúcares proliferan y producen grandes cantidades de alcohol y CO₂ (Madigan *et al.*, 1997).

Las condiciones óptimas para el desarrollo para la mayoría de las levaduras son: temperatura de 28 °C; la actividad acuosa puede variar dependiendo del pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y presencia de sustancias inhibitoras; un pH de entre 4.5 y 6.5, aunque hay especies que toleran grandes variaciones de pH 2.8 a 8.5 (Villamil y Zapata, 1999); en condiciones aerobias las levaduras aprovechan los carbohidratos para producir biomasa y CO₂, pero cuando se encuentran en condiciones de anaerobiosis el metabolismo cambia para producir una menor cantidad de biomasa y más alcohol (Sarmiento *et al.*, 2003).

El balance global de la fermentación de las levaduras en condiciones de anaerobiosis se representa mediante la siguiente ecuación química (Vázquez y Dacosta, 2007):



A pesar de la simplicidad de esta ecuación, la secuencia de transformaciones para degradar una molécula de glucosa hasta dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono es un proceso complejo que involucra dos etapas: (1) la formación en anaerobiosis de 2 moléculas de piruvato a través de la ruta metabólica de Embden-Meyerhof (glucólisis) y (2) la descarboxilación del piruvato en anaerobiosis para dar lugar a dos moléculas de acetaldehído que se reduce a etanol (Hernández, 2003), las etapas de las reacciones se muestran en la figura 7.9.

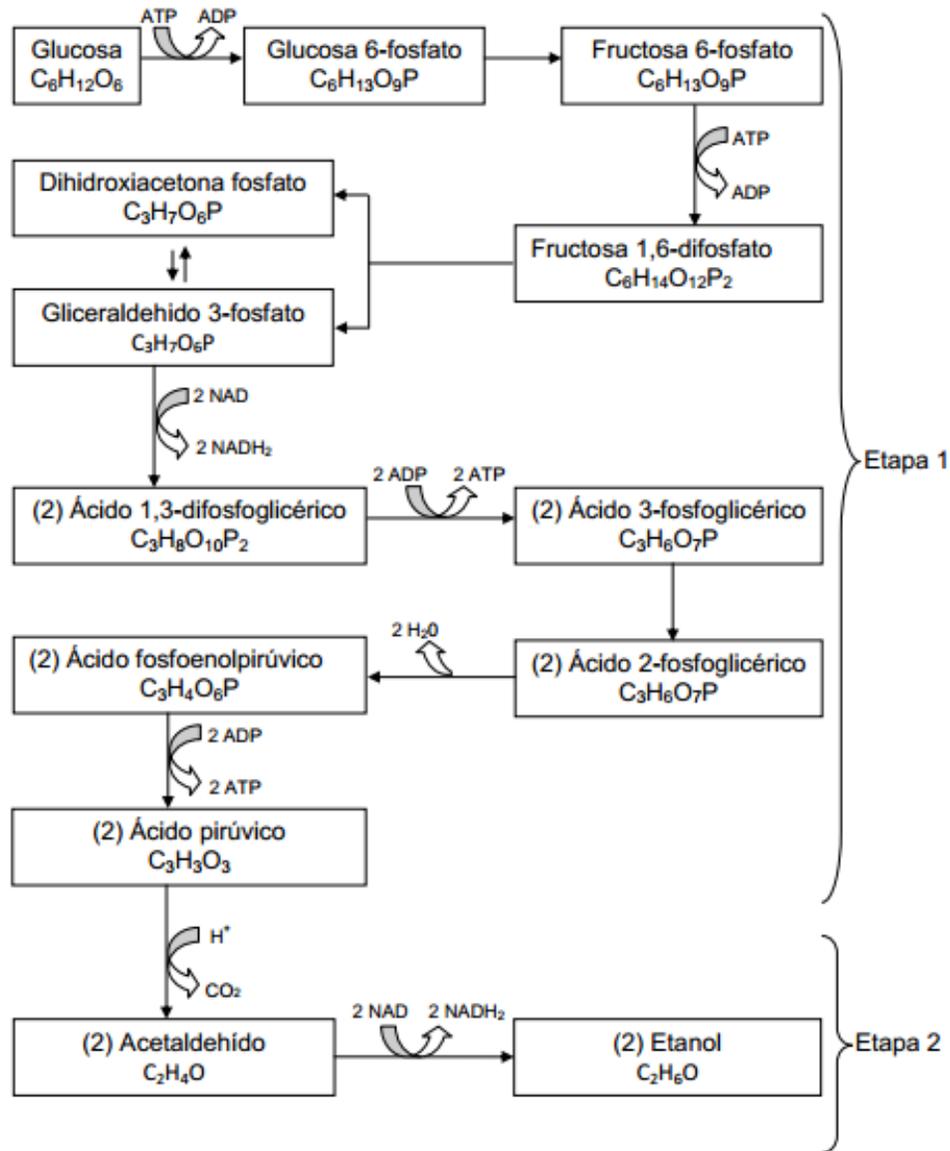


Figura 7.9 Seguimiento de reacciones para obtener etanol a partir de glucosa (Hernández, 2003).

La fermentación llevada a cabo para elaborar mezcal puede realizarse a cabo en tinas de fermentación (Figura 7.10) sin agregar ningún inóculo o bien puede fermentarse en biorreactores, en las que se controla la temperatura, pH y flujo de aire, el jugo se ajusta entre 10 y 12 °Brix, se enriquece con nitrógeno (urea o sulfato de amonio) y se inocula una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es la responsable de que los azúcares se

transformen en gas carbónico y alcohol. Esta operación demora de 2 a 7 días a una temperatura de 25 a 30 °C y se concluye cuando se han agotado los azúcares. El final de la fermentación se establece en un punto de equilibrio entre la cantidad de levadura que se ha desarrollado, el contenido de azúcar y la producción de alcohol. La solución obtenida es llamada “mosto muerto” (Rico, 1995). Actualmente en las industrias mezcaleras, con el fin de lograr una estandarización utilizan fermentadores de acero inoxidable con el que pueden controlar la temperatura de fermentación (Figura 7.11).



Figura 7.10 Tinajas de fermentación



Figura 7.11 Fermentador de acero inoxidable

Para desarrollar una fermentación adecuada es necesario contar con buenas condiciones de anaerobiosis, sustrato suficiente para la levadura, utilizar siempre las mismas cepas de levadura adecuadas para la producción y evitar las contaminaciones por otros microorganismos que pueden producir sustancias no deseadas; controlar durante el proceso las condiciones óptimas de temperatura y tiempo para obtener la mayor cantidad de etanol. El paso del metabolismo aeróbico a anaeróbico es crucial y debe tenerse especial cuidado de eliminar el aire de los fermentadores. Puede haber problemas en la fermentación cuando la concentración de azúcar en el mosto es insuficiente, si hay baja concentración de alcohol o cuando existe contaminación por otras levaduras y bacterias (Bautista *et al.*, 2001)

Según Escalante *et al.* (2008), reporta que el consorcio microbiano dominante en la fermentación alcohólica a partir de jugo de *Agave salmiana* son levaduras *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus*; bacterias *Zymomonas mobilis*

subsp. mobilis y *Zymomonas mobilis subsp. pomaceae*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus farraginis*. Estos microorganismos son los responsables de producir compuestos volátiles que le confieren al mezcal las características sensoriales.

7.5.4.1 Compuestos organolépticos

Durante la fermentación y como resultado del metabolismo de las levaduras se sintetizan además del alcohol, subproductos que están presentes en bajas concentraciones y que son de gran importancia en las propiedades organolépticas del producto final (Melero, 1992). Se ha establecido que la formación de aromas en el proceso de producción de bebidas alcohólicas se divide en 5 etapas:

1. Aromas primarios: Aquellos en los que convergen las interacciones del suelo, clima y método de cultivo; muchos constituyentes del aroma no se presentan hasta ser liberados por la levadura en la fermentación.
2. Aromas prefermentativos. Se dan en la molienda cuando el mosto entra en contacto con el aire, por lo general son alcoholes y aldehídos de formación rápida; en el origen de los aromas prefermentativos influye sobre todo la forma de obtención del mosto.
3. Aromas de la fermentación o secundarios. Ya sea por cambios químicos, por acción de microorganismos como levaduras y bacterias, o por condiciones del proceso.
4. Compuestos formados durante el envejecimiento. se forma por cambios fisicoquímicos durante el añejamiento, algunas sustancias se transforman y otras son extraídas de la madera de las barricas; por ejemplo: 1,1,6-trimetil-1,2-hidronaftaleno, dimetilsulfuro y vainillina.

5. Olores extraños y no deseables. Pueden provenir desde el cultivo, fermentación o añejamiento o a partir de microorganismos indeseables (Lorenzo y Cornejo, 1997).

7.5.5 Destilación

En esta operación se efectúa la separación del alcohol del agua aprovechando para ello sus diferentes puntos de ebullición. El etanol, debido a la 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 su temperatura de ebullición.

El dispositivo utilizado para la destilación es el alambique (Figura 7.12). 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 (Ramales y Ortiz, 2006).

Aunque, la industria del mezcal con el fin de optimizar el proceso de destilación proponen alternativas, como la utilización de torres de destilación (Figura 7.13), constituido por un evaporador, una torre de rectificación, un condensador, un precalentador y un enfriador. El evaporador tiene en su interior un tubo de cobre en forma de serpentín por el que fluye vapor de agua procedente de la caldera, desde el serpentín se transfiere calor al mosto, lográndose la ebullición de los productos volátiles que después de la condensación se obtendrá el mezcal. Asimismo la función de la torre de rectificación es obtener un producto de mejor calidad mediante condensaciones y evaporaciones. El condensado es dividido en dos fracciones: una se regresa a la torre de rectificación y la otra se conduce al precalentador. Este tiene en su interior un serpentín de cobre por el cual circula el mezcal caliente. Este equipo realiza dos operaciones, una consiste en enfriar el mezcal caliente. Este equipo realiza dos operaciones, una consiste en enfriar el mezcal que fluye por el serpentín, y la otra, en calentar el mosto acumulado en el precalentador previo a destilarse. Debido a que no se logra disminuir la temperatura del mezcal a menos de 30 °C se le hace pasar por un enfriador en forma de serpentín sumergido en agua fría procedente de la torre

de enfriamiento. Como producto, se obtienen dos fracciones: la primera parte de la destilación conocida como cabeza (30-40 °G.L) y la conocida como colas (6-30 °G.L).

Entre los problemas que presenta las torres de destilación en el uso industrial para producir mezcal es la limpieza, ya que se requiere de mucho tiempo y esfuerzo para lograrlo, que requiere de desmontar cada una de sus partes requiriendo al menos 3 personas y realizarlos cada quince días, debido al incremento de incrustaciones en la pared del serpentín que disminuye la eficiencia del proceso.



Fig. 7.12 Alambiques de cobre



Fig. 7.13 Destilador de columna de platos

7.5.6 Maduración

Esta operación consiste en el almacenamiento del mezcal en barricas hechas de roble blanco (figura 7.14) con la finalidad de dar un aporte especial a las características organolépticas del mezcal, como suavizar el sabor y conferirle una coloración oscura agradable a la vista. El cambio en el color y sabor del mezcal después de su almacenamiento en barricas se debe principalmente a los compuestos fenólicos principalmente flavonoides y taninos, que se liberan de la madera del barril al mezcal.



Figura 7.14 Barricas para la maduración del mezcal

Los principales fenoles que forman parte de la madera de las barricas donde se hace reposar a las bebidas alcohólicas destiladas entre ellas el mezcal, son las siguientes:

- a) Las flavononas y los flavonoles, ambos se caracterizan por presentar un doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo heterocíclico C y difieren entre si por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 en el segundo, el cual esta ausente en las flavonas (figura 7.15) (Ávila, 2010).

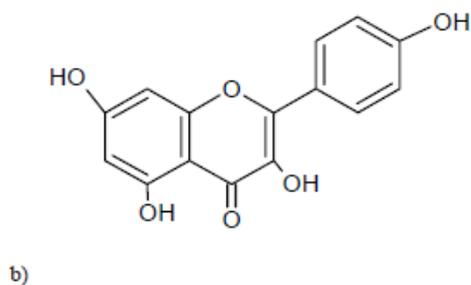
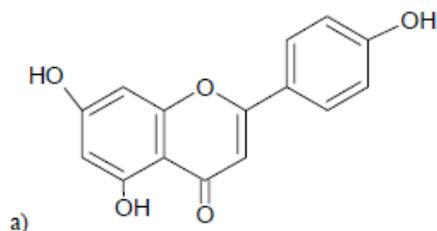


Figura 7.15 Estructura básica de a) flavonas y b) flavonoles (Ávila, 2010).

b) Los flavonoides (Figura 7.16) incluyen cinco tipos diferentes de compuestos: las flavanonas, también llamadas dihidroflavonas; los dihidroflavonoles, también llamados flavanonoles o 3-hidroxiflavanonas; las dihidrochalconas; los flavanos y los flavanoles. En conjunto estos cinco tipos de flavonoides también reciben el nombre de dihidroflavonoides, ya que los carbonos 2 y 3 (o alfa y beta en el caso de las dihidrochalconas) de su estructura química están hidrogenados y no existe un doble enlace entre ellos. Las flavanonas, los dihidroflavonoles y las dihidrochalconas se diferencian de los flavanos y flavanoles por la presencia de un grupo carbonilo en el anillo heterocíclico en los tres primero y su ausencia en los dos últimos (Ávila, 2010).

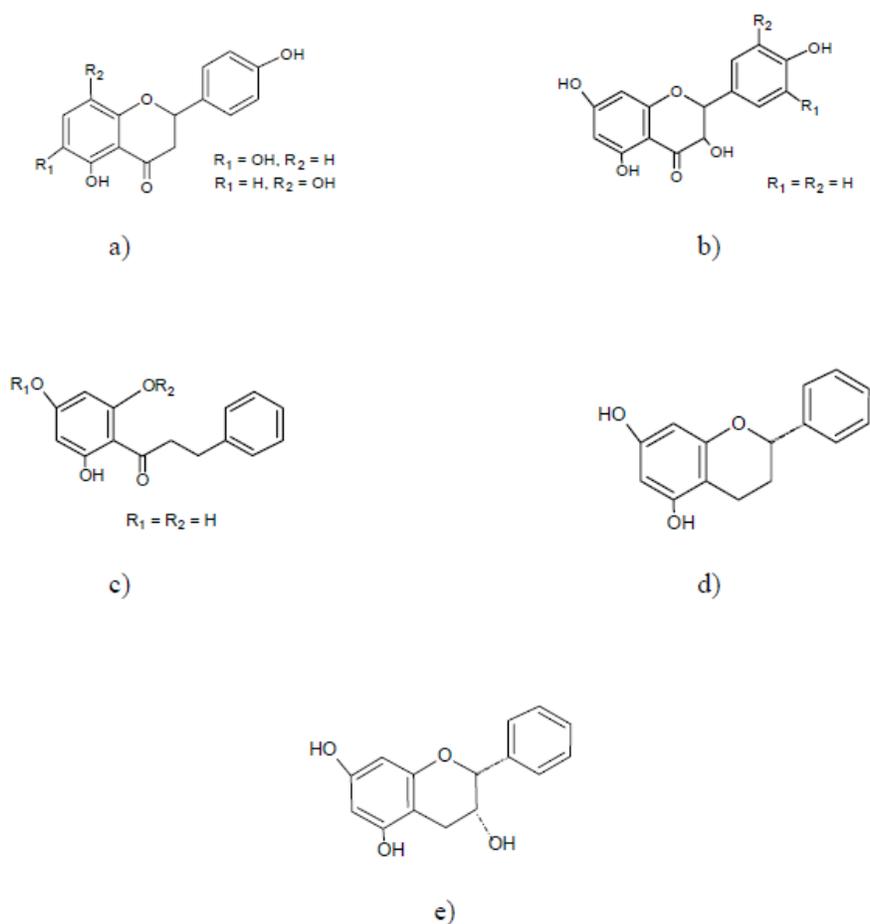


Figura 7.16 Estructura básicas de a) flavanonas, b) dihidroflavonoles, c) dihidrochalconas, d) flavanos y e) flavanoles (Ávila, 2010)

- c) Las antocianinas (Figura 7.17), forma el grupo mas notable de la familia de los flavonoides. Son sustancias coloridas que se caracterizan por carecer de un grupo carbonilo en la posición 4, presentar un grupo hidroxilo en la posición 3 y dos dobles enlaces en el anillo heterocíclico. (Ávila, 2010).

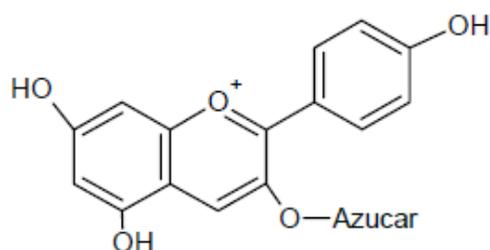


Figura 7.17 Estructura básica de las antocianinas (Ávila, 2010).

- d) Los isoflavonoides (figura 7. 18), se caracterizan por presentar una desviación del anillo fenil (B) de la posición 2 a la 3. éste se considera un grupo heterogéneo, ya que incluye a las isoflavonas, los isoflavanos, los isoflavanoles, además de otros con estructura mas compleja como los rotenoides y los pterocarpanos, los cuales presentan sistemas de anillos heterocíclicos extra. (Dewick, 1994).

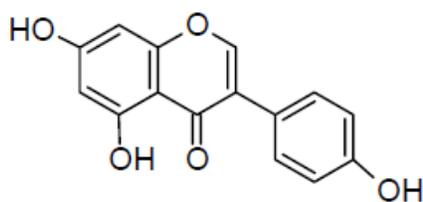


Figura 7.18 Estructura básica de los isoflavonoides (Ávila, 2010).

El período de maduración varía según el tipo de mezcal que se desee obtener. Para el mezcal reposado este se almacena por un periodo de catorce meses en barricas de roble o encino. Mientras que, para el mezcal añejo se requiere de un período de tres años. Las

barricas en las cuales se lleva a cabo el reposado o el añejamiento deben estar en buen estado. Por ello se requiere un lavado que consiste en adicionar piedras pequeñas a las barricas vacías, llenarlas hasta la mitad de su capacidad y hacerlas rodar. El movimiento de las piedras a través de las barricas provoca el arrastre de material indeseable dentro de éstas. Otra operación de mantenimiento de las barricas consiste en llenarlas con agua con la finalidad de que la madera no se seque, originándose la formación de fisuras o en un caso más grave la fragmentación de éstas. Esta operación también se aplica a las tinas de fermentación (Ramales y Ortiz,2006).

7.6 ESTANDARIZACIÓN DE PROCESOS

La estandarización es el registro y la aplicación de los métodos para el desarrollo los procesos y actividades. Para generar una mejora se debe poner bajo control de buenas practicas los desperdicios a los cuales se encuentra sometidos los procesos por medio de una herramienta de estudio de trabajo. Controlada la situación se debe estandarizar el proceso. Este proceso mejorado y estandarizado se someterá posteriormente a infinitos ciclos de mejora mientras la empresa este vigente.

La estandarización es el desarrollo sistemático, aplicación y actualización de patrones, medidas uniformes y especificaciones para materiales, productos o marcas. No es un proceso nuevo, ha existido desde hace mucho tiempo y constituye un método excelente para controlar los costos de materiales de procesos (Tafolla, 2000).

7.7 MEJORAMIENTO EN LOS PROCESOS FERMENTATIVOS

7.7.1 Monitoreo y control de biorreactores

Diversos parámetros como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, la velocidad de agitación y difusión de aire tienen un importante efecto sobre el rendimiento de la fermentación. Para proporcionar un ambiente adecuado, las propiedades del sistema deben estar monitorizadas y así controlar cualquier desviación de los valores deseados. La

monitorización y el control de la fermentación es un área de investigación que ayuda a mejorar el rendimiento de los bioprocesos y así alcanzar en el fermentador una operación uniforme y satisfactoria.

Es necesario conocer las variables críticas que afectan al proceso para poder controlar el estado de la fermentación, tales variables críticas se clasifican en tres categorías: físicas, químicas y biológicas. En el cuadro 7.9 se muestran algunos ejemplos de variables de procesos pertenecientes a cada una de las tres categorías.

A pesar de la importancia de la monitorización de la fermentación no existen a nivel industrial instrumentos fiables y sensores capaces de dar una respuesta rápida, precisa y directa para muchas variables del proceso (Doran, 1998).

Cuadro 7.9 Parámetros medidos o controlados en los biorreactores (Doran, 1998)

Físicos	Químicos	Biológicos
Temperatura	pH	Concentración de biomasa
Presión	Oxígeno disuelto	Concentración de enzima
Nivel del líquido	CO ₂ disuelto	Morfología
Velocidad del agitador	Composición del gas de salida	Viabilidad

Muchas variables importantes, como la concentración de biomasa, no pueden medirse en línea como puede hacerse con el pH. En vez de ello, las muestras deben ser recogidas y llevadas al laboratorio para su posterior análisis. Como las condiciones de fermentación pueden variar mientras se realiza el análisis en el laboratorio, la acción de control en dicha medición no resulta efectiva. Las mediciones “fuera de línea” se utiliza en las fermentaciones industriales para el análisis de las concentraciones de biomasa, carbohidratos, proteínas, lípidos y fosfatos.

Ejemplos de mediciones que pueden realizarse en línea en la industria son la temperatura, la presión, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, el caudal, la velocidad de agitación, la potencia consumida, el nivel de espuma, el peso del caldo y la composición del gas. Debido al coste que conlleva su instalación y a las consecuencias financieras que puede acarrear el fallo del instrumento durante la fermentación, los dispositivos de medida utilizados en la industria deben cumplir unos estrictos criterios de rendimiento. Éstos incluyen: precisión dentro de la escala del 1-2% de la escala completa, operación fiable durante al menos el 80% del tiempo, bajo mantenimiento esterilizables con vapor, sencillez de manejo y rápida calibración.

En una fábrica de fermentación a nivel industrial pueden monitorearse un gran número de variables diferentes al mismo tiempo. El instrumento tradicional de recogida de información en línea es el registrador de diagrama. Sin embargo con la creciente utilización de computadoras en la industria de la fermentación se está realizando cada vez más la recogida de datos de manera digital. Debida a la enorme cantidad de información obtenida de la monitorización continua de los bioprocesos, un problema que se plantea actualmente en la industria es el tratamiento y utilización efectiva de dicha información (Doran, 1998).

7.7.2 Análisis de las medidas

Cualquier intento de analizar o aplicar los resultados de la monitorización de la fermentación debe tenerse en cuenta los errores y resultados falsos o transitorios existentes en los datos. El ruido y la variabilidad son problemas que se encuentran en ciertas medidas del proceso de fermentación. En muchos casos debe de realizarse un importante suavizado de señal con el fin de reducir el ruido en estos datos antes que puedan ser aplicados para el modelado y control de procesos. Los sistemas de adquisición y tratamiento de datos más avanzados disponen de utilidades para el suavizado de la señal.

Algunas veces se utilizan los datos originales para calcular las variables derivadas que caracterizan el rendimiento del fermentador. Las variables derivadas más comunes son la

velocidad de consumo de oxígeno, la velocidad de evolución del dióxido de carbono, el coeficiente respiratorio RQ y el coeficiente de transferencia de materia kLa (Doran, 1998).

7.7.3 Análisis en los fallos de funcionamiento

Los fallos en la operación del reactor afectan al 15-20% de las fermentaciones industriales. Las medidas realizadas sobre la fermentación pueden utilizarse para detectar fallos en el funcionamiento. Por ejemplo, las señales de un sensor de flujo podrían utilizarse para detectar bloqueos en una tubería y disparar una alarma en la sala de control de la fábrica. Normalmente, sin embargo, los mismos sensores son los componentes más propensos a sufrir fallos. En el cuadro 7.10 se muestra la duración media entre roturas de algunos instrumentos utilizados en fermentación. El fallo de un sensor puede detectarse cuando existe una variación en las características del ruido del instrumento. Son varias las estrategias que pueden utilizarse para reducir el impacto que suponen los fallos en los fermentadores a gran escala, entre las que pueden citarse la comparación de las medidas con valores históricos, el cruce de datos entre medidas independientes, y la utilización de varios sensores simultáneos (Doran, 1998).

Cuadro 7.10 Fiabilidad del equipo de fermentación (Doran, 1998)

Equipo	Fiabilidad	Tiempo medio entre fallos (semanas)
Sonda de temperatura	-	150-200
Sonda de pH	98%	9-48
Sonda de oxígeno disuelto	50-80%	9-20
Espectrómetro de masas	-	10-50
Analizador de O ₂ paramagnético	-	24

7.7.4 Cálculo del estado de proceso

A menudo existen importantes retrasos en la medición “fuera de línea” de variables tan importantes como las concentraciones de biomasa, sustrato y producto. Tales retrasos, aun realizando los análisis en el menor tiempo posible, dificulta el control del reactor si la acción del control depende del valor de estos parámetros. Una solución a este problema consiste en utilizar las medidas en línea junto con modelos matemáticos del proceso con el fin de conocer las variables desconocidas. Los programas de ordenador y los procedimientos numéricos desarrollados para alcanzar dicho propósito se denominan sensores “software”, estimadores u observadores.

Una estrategia para calcular el estado del proceso es la técnica de los balances de materia. La biomasa se puede medir a partir de la estequiometría y de otras medidas del proceso mediante balances elementales. Este modelo es apto para la fermentación de determinados medios aunque es difícil de aplicar con ingredientes de medio de cultivo complejos como la melaza, la hidrólisis de la caseína, la semilla de soja y el licor de extracto de maíz que presentan una composición elemental indefinida (Doran, 1998).

7.8 CONTROL ESTADÍSTICO DE PROCESOS

Las técnicas del control estadístico de procesos comenzaron a ser desarrolladas en 1920 en EEUU por W. A. Shewart, cobrando especial importancia en la Segunda Guerra Mundial en las empresas de armamento. A partir de entonces el control de procesos ha ido evolucionando respondiendo a las necesidades de la industria dando lugar a dos corrientes. La primera llamada control estadístico de procesos y la segunda control adaptativo o automático de procesos.

El control estadístico de procesos tiene como objetivos principales:

- 1) Minimizar la producción defectuosa.
- 2) Mantener una actitud de mejora continua del proceso.
- 3) Comparar la producción respecto a las especificaciones.

Para poder llevar a cabo estos objetivos hay que tomar en cuenta la información que genera el proceso, esta información se puede obtener tomando datos numéricos de las características de los productos que sale del proceso y tratándola adecuadamente. La información permite “escuchar” el proceso y poder llevar a cabo los objetivos anteriormente citados.

Con la filosofía actual de la calidad total, no basta con conseguir el objetivo de minimizar la producción defectuosa; hay que mantener una mejora continua y los estándares internos de fabricación se han de ir cambiando independientemente de las especificaciones externas del cliente.

Además, las técnicas del control estadístico de proceso han de ser aplicadas lo más próximas posibles al proceso que genere la información para poder disminuir el tiempo de reacción ante el proceso. Por ello, han de ser sencillas de utilizar e interpretar para que los operarios puedan utilizarlas sin apenas necesitar la ayuda de los especialistas.

El uso del control estadístico de procesos lleva implícitas algunas hipótesis que describiremos a continuación:

- 1) Una vez que el proceso está en funcionamiento bajo condiciones establecidas, se supone que la variabilidad de los resultados en la medición de una característica de calidad del producto se debe sólo a un sistema de causas aleatorias, que es inherente a cada proceso en particular.
- 2) El sistema de causas aleatorias que actúa sobre el proceso genera un universo hipotético de observaciones (mediciones) que tiene una Distribución Normal.
- 3) Cuando aparece alguna causa asignable provocando desviaciones adicionales en los resultados del proceso, se dice que el proceso está fuera de control. La función del control estadístico de procesos es comprobar en forma permanente si los resultados que van surgiendo de las mediciones están de acuerdo con las dos primeras hipótesis. Si aparecen uno o varios resultados que contradicen o se oponen a las mismas, es

necesario detener el proceso, encontrar las causas por las cuales el proceso se apartó de su funcionamiento habitual y corregirlas (Prat, 1999).

7.8.1 Variabilidad

En la práctica, existen siempre variaciones en las entradas de un proceso y, en consecuencia, existirán diferencias (variaciones) entre las características de las distintas unidades de producto obtenidas como salida del proceso.

Si, por ejemplo, consideramos un cierto proceso de mecanización de piezas de acero y de cada pieza medimos su diámetro, el histograma de la parte derecha de la figura representara la variabilidad del diámetro de las distintas piezas producidas. Toda variabilidad tiene sus causas, y el hecho de que los diámetros de las piezas fabricadas en el mismo proceso sean distintos es la consecuencia de las variaciones de la materia prima, la variabilidad de la mano de obra, o de la variabilidad de cualquier entrada del proceso (Prat, 1999).

Bajo supuestos muy generales, las pérdidas que un producto causa a la sociedad cuando se utiliza son directamente proporcionales a la variabilidad de las características de calidad de producto en cuestión. Así pues, la estrategia básica para la mejora de la calidad pasa por la identificación de las causas que producen variabilidad, y por una correcta asignación de la misma a una u otra de las dos categorías definidas por Shewhart:

- 1) Causas comunes, cuya eliminación es la dirección de la empresa y que acostumbran a ser responsables de más del 90% de los problemas de calidad.
- 2) Causas asignables, cuya eliminación es más sencillas y son responsabilidad del operario, si bien representa menos del 10% de los problemas de calidad de un cierto proceso.

Aunque no existe una definición precisa de estos dos tipos de causas, en la cuadro 7.11 se encuentran algunas características de cada uno de ellos.

Cuadro 7.11 Características de las causas de la variabilidad (Prat, 1999).

Causas comunes	Causas asignables (específicas)
<ul style="list-style-type: none"> • Suelen ser muchas y cada una produce pequeñas variaciones. • Son parte permanente del proceso. Su suma (superposición) determina la capacidad del proceso. • Son difíciles de eliminar. Forma parte del sistema y es responsabilidad de la dirección disminuir sus efectos. • Afectan al conjunto de maquinas, operarios, etc. • La variabilidad debida a estas causas admite representación estadística 	<ul style="list-style-type: none"> • Suelen ser pocas pero de efectos importantes. • Aparecen esporádicamente en el proceso. Este hecho facilita su identificación y eliminación (gráficos de control). • Son relativamente más fáciles de eliminar por parte de operarios o técnicos. • Afectan específicamente a una maquina, operario, etc. • No admite representación estadística.

7.8.2 Gráficos de control

Los gráficos de control o cartas de control son una importante herramienta utilizada en control de calidad de procesos. Básicamente, una carta de control es un gráfico en el cual se representan los valores de algún tipo de medición realizada durante el funcionamiento de un proceso continuo, y que sirve para controlar dicho proceso. Es una herramienta estadística que detecta la variabilidad, consistencia, control y mejora de un proceso. La gráfica de control se usa como una forma de observar, detectar y prevenir el comportamiento del proceso a través de sus pasos vitales. Así mismo nos muestra datos en un forma estática, tienen por supuesto sus aplicaciones, y es necesario saber sobre los cambios en los procesos de producción, la naturaleza de estos cambios en determinado período de tiempo y en forma dinámica, es por esto que las gráficas de control son ampliamente probadas en la práctica (Prat, 1999).

7.8.2.1 Características generales de las gráficas de control

El término consistencia se refiere a la uniformidad en la salida del proceso; es preferible tener un producto de un proceso consistente, que tener uno con calidad superior, pero de un proceso intermitente.

Una gráfica de control se inicia con las mediciones considerando, sin embargo que las mediciones dependen tanto de los instrumentos, como de las personas que miden y de las circunstancias del medio ambiente , es conveniente anotar en las gráficas de control observaciones tales como cambio de turno, temperatura ambiente (Riu, 2006).

7.8.2.2 Construcción de las gráficas de control

El fundamento de los gráficos de control se basa en la regularidad de los resultados de medida: cuando se lleva a cabo algún proceso (por ejemplo, un método de análisis) de forma sistemática, es decir, bajo las mismas fuentes de influencia o variación, el proceso se verá afectado por errores aleatorios que conducirán a una distribución normal de los resultados. Esta afirmación es una consecuencia del teorema del límite central. Se dirá que el método analítico está bajo control si los resultados obtenidos con este método siguen las características de una distribución normal. Por ejemplo, aproximadamente el 67% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control $\pm 1s$ (donde s es desviación estándar asociada a los análisis de la muestra de control con el procedimiento que se desea monitorizar), aproximadamente el 95% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control $\pm 2s$ y aproximadamente el 99% de los resultados han de encontrarse dentro del intervalo: valor de la muestra de control $\pm 3s$ (Figura 7.19). Cuando los resultados de los análisis de la muestra de control a lo largo del tiempo se encuentran dentro de los límites aceptados, se dice que el sistema se encuentra bajo control estadístico. Cuando se encuentran puntos fuera de los límites especificados, o se encuentran tendencias, se dice que el sistema se encuentra fuera de control (Riu, 2006).

En la construcción de un gráfico de control podemos distinguir las siguientes etapas:

- Etapa de aprendizaje. En esta etapa se obtienen los resultados iniciales con la muestra de control. En el caso de utilizar una muestra real, se debería comprobar la normalidad y la presencia de resultados discrepantes y su eliminación. Con los resultados iniciales de la muestra de control se establece el valor de la línea central. Este valor debería obtenerse con un mínimo de 15- 30 análisis de la muestra de control. Los diferentes límites suelen establecerse a una distancia del valor central $\pm 2s$ (línea de aviso), y a una distancia del valor central $\pm 3s$ (línea de control). Estas líneas pueden observarse en la figura 7.19.

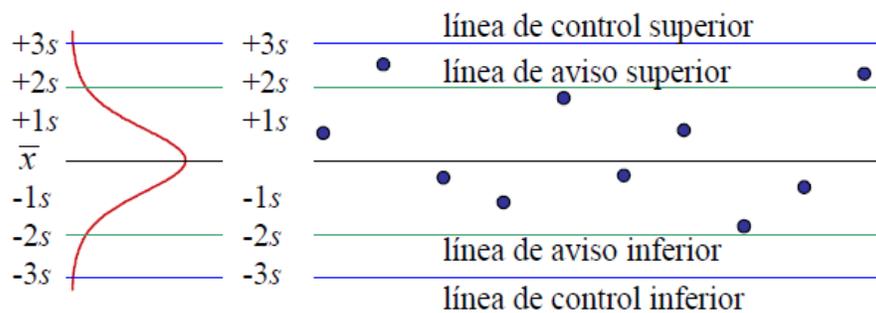


Figura 7.19 Líneas de aviso y de control en un gráfico de control (parte derecha), y su relación con la distribución de la muestra de control.

Los límites de aviso y de control situados a unas distancias de $\pm 2s$ y $\pm 3s$ respectivamente, pueden construirse utilizando los valores 2 y 3 cuando el valor promedio de la muestra de control ha sido encontrado con un número suficientemente grande de repeticiones (alrededor de 30). En este caso se asume que se conocen los valores reales de los parámetros (promedio y desviación estándar). Si se tienen menos repeticiones, se aconseja considerar que los valores reales de estos parámetros son desconocidos, y se deben efectuar correcciones sobre la asunción de distribución normal. Esto implica utilizar valores tabulados en lugar de los valores 2 y 3. Normalmente un laboratorio empieza considerando como desconocidos los valores de los parámetros, hasta que se han recogido suficientes datos como para poder considerar estos parámetros como conocidos (Riu, 2006).

- Etapa de control. En esta etapa se representan frente al tiempo los diversos resultados de la muestra de control con el objetivo de detectar tendencias y situaciones fuera de control.

7.8.2.3 La utilización de los gráficos de control

Los gráficos de intervalos son especialmente efectivos para detectar dispersiones anómalas o ‘saltos’, por lo que se recomienda que se utilicen tanto los gráficos de valores individuales como los gráficos de promedios conjuntamente con los gráficos de intervalos, ya que este último tipo de gráficos son efectivos para controlar desviaciones a partir del valor promedio, tendencias y modelos anómalos.

La confirmación sobre si el sistema se encuentra bajo control estadístico se obtiene por lo tanto, mediante la observación visual del gráfico de control: si los puntos representados en el gráfico se encuentran distribuidos de una forma aproximadamente aleatoria, se dice que el sistema se encuentra bajo control estadístico. Por ejemplo, en los gráficos de promedios o valores individuales, la probabilidad de que un punto caiga fuera de los límites de aviso es aproximadamente del 5%, pero la probabilidad de que dos puntos consecutivos, o dos de tres puntos consecutivos caigan fuera de los límites de aviso es muy baja. Por lo tanto, cuando esto ocurre, tenemos una indicación de que el procedimiento debería ser inspeccionado. Los gráficos de control nos pueden ayudar a detectar los siguientes efectos:

- Aparición de un sesgo: cuando una serie consecutiva de valores se distribuye a un lado de la línea central, pero sin variar la precisión del procedimiento. Esto provoca un cambio en el valor promedio (Figura 7.20a).

- Aparición de una progresiva tendencia a obtener valores crecientes o decrecientes: deriva (Figura 7.20b).

- Cambios cíclicos o periódicos (Figura 7.20c)

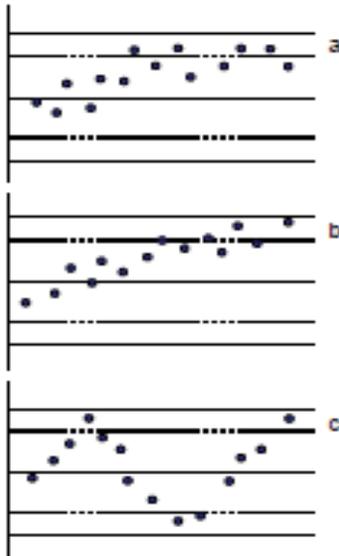


Figura 7.20 Algunos cambios en el procedimiento analítico que podemos detectar con los gráficos de control.

Cuando los gráficos de control se utilizan de esta manera, son muy adecuados para detectar sesgos muy significativos, o un incremento en las fluctuaciones aleatorias, pero no son muy efectivos para detectar pequeños sesgos o derivas lentas del procedimiento (Riu, 2006).

Existe una serie de reglas muy conocidas para evaluar si un sistema se encuentra bajo control estadístico utilizando los gráficos de promedios o de valores individuales (los más utilizados). Estas reglas son las reglas de la Western Electric, y para utilizarlas es conveniente dividir el gráfico de control en tres zonas:

- zona central: de $-1s$ a $+1s$
- zona de aviso: de $-1s$ a $-2s$ y de $+1s$ a $+2s$
- zona de control: de $-2s$ a $-3s$ y de $+2s$ a $+3s$

Se considera que el procedimiento analítico se encuentra fuera de control, o que ha cambiado significativamente, cuando hay:

- 1 punto más allá de la zona de control: se estima que la probabilidad de que pase esto es suficientemente baja (de hecho es inferior al 0.3%) como para sospechar que el sistema está fuera de control.

- 2 de 3 puntos consecutivos en la zona de control: similar al caso anterior, ya que la probabilidad de que esto suceda es inferior al 0.0625%.

- 6 puntos consecutivos en línea ascendente o descendente: se considera que el sistema sigue una tendencia no aleatoria.

- 9 puntos consecutivos a un lado de la línea central (ya sea por encima de ella o por debajo): este caso suele constituir un desplazamiento del promedio o del valor central, generalmente debido a un cambio significativo en el sistema.

- 14 puntos consecutivos alternando arriba o abajo: fenómeno cíclico o series temporales.

- 15 puntos consecutivos en la zona de control: esto implica una mejora de la precisión y una menor desviación estándar asociada. Se tendrían que volver a recalcular los límites de aviso y de control.

- 4 de 5 puntos consecutivos en la zona de aviso o más allá.

- 8 puntos consecutivos por encima y por debajo de la zona de control: 2 poblaciones diferentes.

8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

8.1 Actividades desarrolladas en el proceso para la obtención del mezcal

Se realizaron actividades tanto en el área de producción de inóculo, como en el área de obtención de jugo de *Agave salmiana* (Figura 8.1).

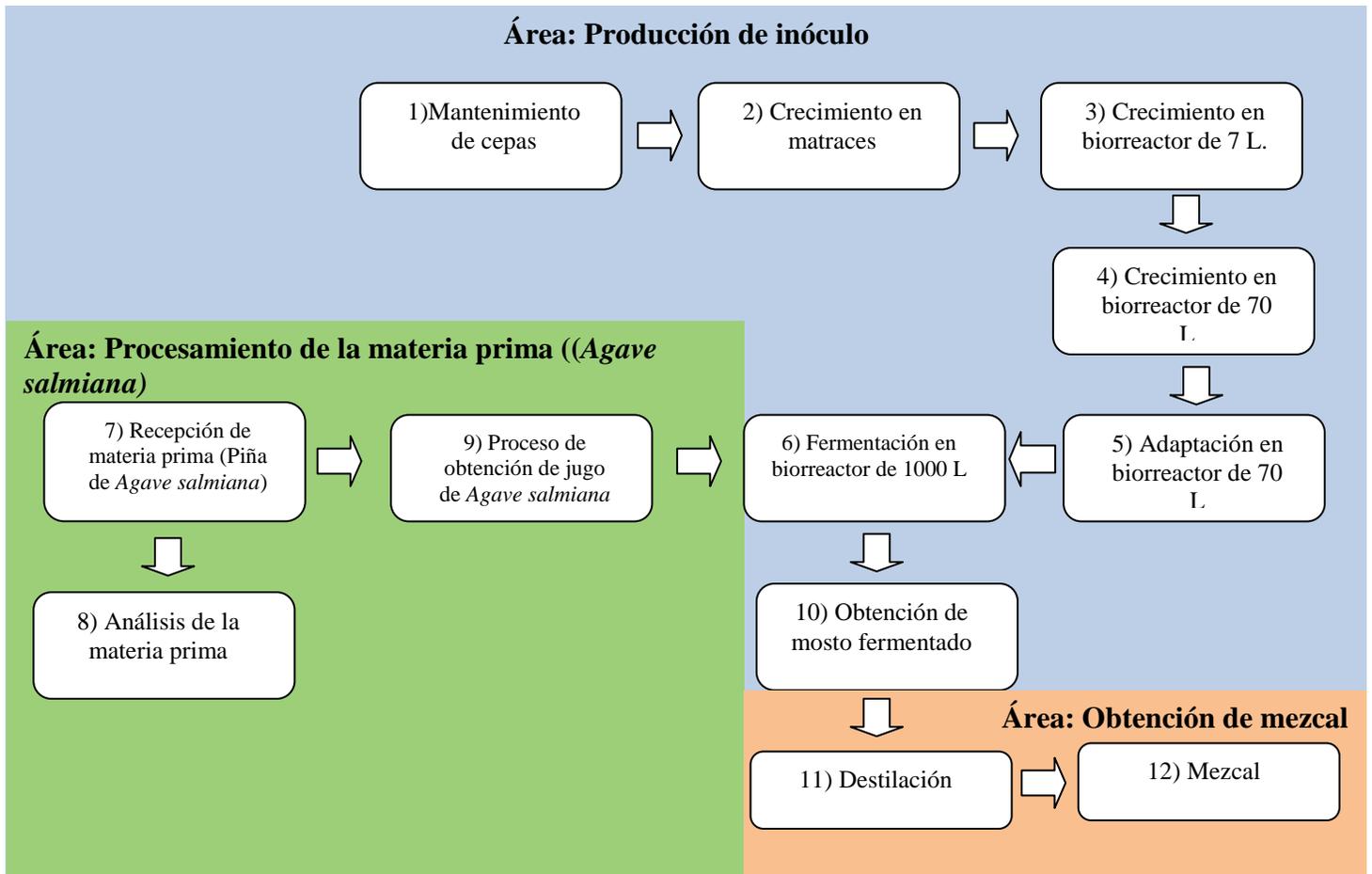


Figura 8.1 Diagrama de flujo de las etapas involucradas en la generación de inóculo y en el procesamiento de la materia prima.

En el área de procesamiento de materia prima se analizó el contenido de sólidos solubles y de humedad del *Agave salmiana* que eran traídas para su procesamiento en la obtención del jugo, el procedimiento se detalla en el punto 8.7. Mientras que en el área de producción de inóculo se realizaron las etapas que se muestran en la figura 8.1, además de realizar los monitoreos en cada una de ellas. A continuación se explica cual es el objetivo de cada una de las etapas, así como los análisis que se realizaron.

Etapas 1: Mantenimiento de cepas

Se mantuvieron 3 cepas nativas puras (nombradas en este trabajo como Beige, Cool-A y PGA.), previamente aisladas y seleccionadas de una fermentación espontánea de jugo de agave por su capacidad fermentativa, trabajo desarrollado por Naverrete *et al.*, 2003. Estas tres cepas se resembraron en tubos que contenían medio sólido de agar papa dextrosa (PDA), se incubaron por 24 h a 28°C y posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 10°C. En esta etapa no se realizó ningún monitoreo de las levaduras.

Etapas 2: Crecimiento en matraces

Esta etapa consistió en desarrollar cada una de las levaduras por separado en matraces Erlenmeyer que contenían 100 mL de medio líquido papa-dextrosa con concentración de 24 g/L, la cepa Beige y Cool-A se incubaron por 24 h y la cepa PGA por 20 h, con una temperatura de 28 °C y una velocidad de agitación de 120 rpm, después de este tiempo se procedió a la inoculación del 10% al biorreactor de 7 L. Se realizó conteo celular en cámara de Neubauer marca Blau modelo 717805, para determinar el crecimiento de cada una de las cepas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de cuadros contados}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$$

Etapa 3: Crecimiento en biorreactor de 7 L

Esta etapa consistió en el crecimiento de las levaduras en un biorreactor de 7 L de capacidad marca Applikon sistem , con 5 L de medio preparado con azúcar y fécula de papa (medio papa-azúcar) con concentración de 20.4 g/L, se inoculó con el contenido de los matraces de la etapa anterior, la fermentación se desarrolló durante 6 h a 33 °C, con una agitación de 100 rpm y velocidad de flujo de aire de 0.036 L/min . Se tomaron muestras a la 0 y 6 h y se determinó el crecimiento celular en cámara de Neubauer; sólidos solubles con refractómetro marca Atago modelo Master-52 y potenciómetro para medir pH marca Denver Instrument modelo D-12.

Etapa 4: Crecimiento en biorreactor de 70 L

El fermentador fue inoculado con 10% de inóculo proveniente de la etapa anterior, el biorreactor de 70 L de capacidad marca Applikon modelo ADI-1030, contenía 60 L de medio papa-azúcar con concentración de 20.4 g/L, la fermentación se desarrolló durante 6 h a 33 °C, con una agitación de 100 rpm y velocidad de flujo de aire de 0.036 L/min. Se tomaron muestras a las 0 y 6 h, en esta etapa se evaluó el crecimiento celular, sólidos solubles y pH.

Etapa 5: Adaptación en biorreactor de 70 L

En esta etapa se realizó el cambio de medio papa-azúcar a jugo *Agave salmiana* drenando 36 L de medio papa-azúcar y colocando la misma cantidad de jugo de *Agave salmiana* formulado a 12 °Brix, al biorreactor de 70 L. Esta etapa demoró 36 h y se realizaron tomas de muestras a las 0, 12 y 36 h para determinar el crecimiento celular , sólidos solubles, pH, contenido de alcohol en grados Gay Lussac con alcoholímetro de varilla marca Alla modelo 2001TC, azúcares reductores por el método DNS y furanos (dihidroximetil furfural y furfural) método desarrollado por Navarrete *et al.*, 2003. Aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{mg}{L} \text{ Furanos} = \frac{(X_{284nm} - X_{320nm}) - 0.06}{0.141} \times \text{Factor de dilución}$$

Etapa 6: Fermentación en biorreactor de 1000 L

El biorreactor de 1000 L, fabricado con acero inoxidable, y que contenía 700 L de jugo de *Agave salmiana* formulado a 12 °Brix fue inoculado con el contenido del biorreactor de 70 L (etapa 5). Las etapas 1 a 5 fueron desarrolladas con la intención de generar un inóculo adaptado al jugo de agave y con la concentración suficiente para que en esta etapa se alcanzara un rendimiento de etanol de 25 °GL. La fermentación demoró 72 h, se realizaron monitoreos a las 0, 24, 48 y 72 h para determinar el crecimiento celular, sólidos solubles, pH, azúcares reductores, furanos y contenido de alcohol en grados Gay Lussac.

8.2 Registro de actividades para la generación de inóculo

Las diferentes actividades que conlleva la generación de inóculo (resiembra, crecimiento en matraz, crecimiento en biorreactor de 7 y 70L), desarrolladas en el Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya, fueron registradas de manera detallada. Se tomó nota de los tiempos de proceso, actividades de los operarios, condiciones de operación, además de identificar las corrientes de entrada y salida de cada etapa del proceso.

Los tiempos de cada operación fueron medidos con un cronómetro digital marca Cronus. Por otra parte, el seguimiento de las actividades se realizó por observación, mientras que las dudas fueron resueltas mediante preguntas directas a los involucrados en el proceso. Tanto el registro de los tiempos como el de las actividades se anotaron en la bitácora de la empresa BIPI-DYP-01. Los parámetros considerados dentro de las condiciones de operación, a lo largo de las etapas del proceso; temperatura, velocidad de agitación y aireación; se escribieron en una libreta personal.

Las corrientes de entrada y salida poseen características y secuencias de procesamiento únicas para cada etapa del proceso, por lo que se llevó a cabo una descripción detallada de las condiciones de los elementos involucrados en las operaciones de la generación de inóculo, información que fue utilizada para generar un diagrama de operación.

8.3 Registro de análisis y resultados en el monitoreo de la generación de inóculo

Durante la estancia que se realizó en la planta piloto del Instituto Tecnológico de Celaya, se recibió capacitación del supervisor de producción, el Ing. Josué Joaquín Grande Trejo, en las técnicas de azúcares reductores, furanos, concentración de alcohol en grados Gay-Lussac, determinación de pH, sólidos solubles y conteo celular. Los métodos empleados en estos análisis fueron anotados en una libreta personal con la finalidad de hacer los análisis posteriormente.

8.4 Análisis de la variabilidad de los parámetros de control

La información de las actividades en la producción del fermentador semilla fueron proporcionadas de manera verbal por parte del supervisor de producción, ésta información fue recopilada en libreta personal para seguir de manera sistemática la metodología que se había venido realizando. Con los datos de salida generados en el monitoreo de cada una de las etapas, se procedió a realizar la normalización de los datos para observar la variación en porcentaje de los datos individuales respecto a la media, utilizando la siguiente expresión:

$$\left(\frac{x - \bar{x}}{\bar{x}} \right) 100$$

donde:

x es el valor individual

\bar{x} es el promedio de los valores

Una vez que fueron normalizados los datos se elaboraron en hojas de cálculo, gráficas de variabilidad de los datos. A partir de estas gráficas se determinó los límites de control permisibles, tanto superior como inferior, calculando el promedio de los valores de cada una de las variables medidas a lo largo de la producción del fermentador semilla y estableciendo un margen de $\pm 10\%$ con respecto a la media de cada una de las variables, tomándose las corridas en donde se obtuvieron concentraciones mayores de 5% v/v de alcohol (25°GL) en la última etapa fermentativa.

8.5 Análisis para la identificación de variables críticas de control

Para la identificación de variables críticas de control en la producción del fermentador semilla, se realizaron en hojas de cálculo distintas gráficas de correlación entre la variable de respuesta principal (contenido de alcohol en fermentador de 1000 L) contra las variables de proceso (Biomasa, pH, furanos, azúcares reductores y grados Brix). Las gráficas obtenidas fueron evaluadas de forma individual para descartar las variables que no presentaron influencia sobre nuestra variable de respuesta; las que se observaron con una mayor influencia fueron puestas a consenso con el grupo de trabajo en producción, para determinar cuáles de estas variables se consideraban como puntos críticos de control.

8.6 Elaboración de manuales

A partir de la información recabada, en libreta personal y en la bitácora BIPI-DYP-01, se elaboró el manual de procedimientos, donde se detalló las actividades que se realizaron para obtener un inoculante seguro con especificaciones dentro del intervalo de variabilidad permitido.

8.7 Variabilidad de la materia prima

Cada semana se procesaron dos lotes de piñas de *Agave salmiana*, aproximadamente de 900 kg cada una, provenientes de las plantaciones de San Pedro Almoloyán y de San Antonio del Maguey, pertenecientes al municipio de San Felipe Torres Mochas, Guanajuato.

Las piñas fueron pesadas en una báscula marca Tecnocor, teniendo un peso aproximado de 150 Kg, este peso fue anotado en la hoja de registro de la bitácora de producción de mezcal en la sección de materia prima. Después de ser pesadas, fueron cortadas en octavos de donde se tomaba, para cada una de las piñas, una muestra de corazón y hoja (aproximadamente 50 g). Las muestras eran procesadas en el Laboratorio de Bioingeniería para determinar el contenido de sólidos solubles (°Brix), con un refractómetro manual marca Atago y el porcentaje de humedad mediante un secador de flujo laminar marca Siemens.

Para la determinación de sólidos solubles, era necesario trocear las muestras para extraer unas gotas de jugo con un exprimidor de limón y colocarlas en el refractómetro para su posterior lectura, el registro se hacía en una libreta personal.

El porcentaje de humedad se obtenía pesando 5 gramos de muestra en charolas de malla de acero; las muestras eran colocadas en el secador a una temperatura de 90°C por un tiempo de 24 h y por diferencia de pesos se obtenían los gramos de humedad.

9. RESULTADOS

9.1 Actividades desarrolladas en la producción de inóculo

Las anotaciones de las actividades desarrolladas en la producción de inóculo (fermentador semilla) en la bitácora BIT-DYP-01, se emplearon para realizar un diagrama de operación de la preparación del fermentador semilla que se encuentra bajo resguardo de la empresa DYPICURIAN S.A de C.V. y no se encuentra publicado en este trabajo debido al convenio de confidencialidad firmado con la empresa.

Los manuales de procedimientos se realizaron de acuerdo a lo anotado en la bitácora BIT-DYP-01 con la intención de generar inóculo dentro de los límites de control permisibles, estos manuales fueron diseñados de acuerdo a las actividades necesarias en las etapas de producción de inóculo para eliminar los errores humanos producidos por los vicios de una mala técnica empleada desde la preparación de medios de fermentación hasta una toma de muestra inadecuada.

9.2 Registro de análisis y resultados para el monitoreo de la generación de inóculo

Los resultados de los análisis de muestreos, generaron información que fue concentrada en la bitácora BIPI-DYP-01, que se encuentra bajo el resguardo de la empresa DYPICURIAN S.A. de C.V. La concentración de datos fue utilizada para realizar posteriormente el análisis de la variabilidad del proceso.

9.3 Análisis de la variabilidad de los parámetros de control

Con los datos registrados en la bitácora BITI-DYP-01, se procedió a realizar gráficos de control para cada una de las etapas involucradas en la generación de inóculo, mostrando como los datos varían en porcentaje de acuerdo a la media (representada como cero). Se consideraron los datos de salida en cada fase de la producción, debido a que nos

proporciona información del comportamiento que tuvieron las cepas a lo largo de la producción de inóculo; pudiéndose anticipar si se obtendrá una fermentación esperada de acuerdo a los límites de producción de alcohol.

En las figura 9.1 a la 9.5 se observa el comportamiento de cada una de las cepas en las diferentes corridas evaluadas, durante las corridas generadas de la Bio 23 a la Bio 44, se realizaron mediante la aplicación de los procedimientos en cada una de las etapas, para evitar la variabilidad descontrolada en el proceso de fermentación, lo que dio como resultado un ajuste en los parámetros monitoreados a lo largo de la fermentación.

A continuación se presentan el análisis del comportamiento de las gráficas generadas a lo largo del proceso de fermentación para cada una de las corridas. En las distintas gráficas se puede observar un comportamiento con altas fluctuaciones en los parámetros monitoreados, que después se ven suavizados por la aplicación correcta de los procedimientos para la generación de inóculo.

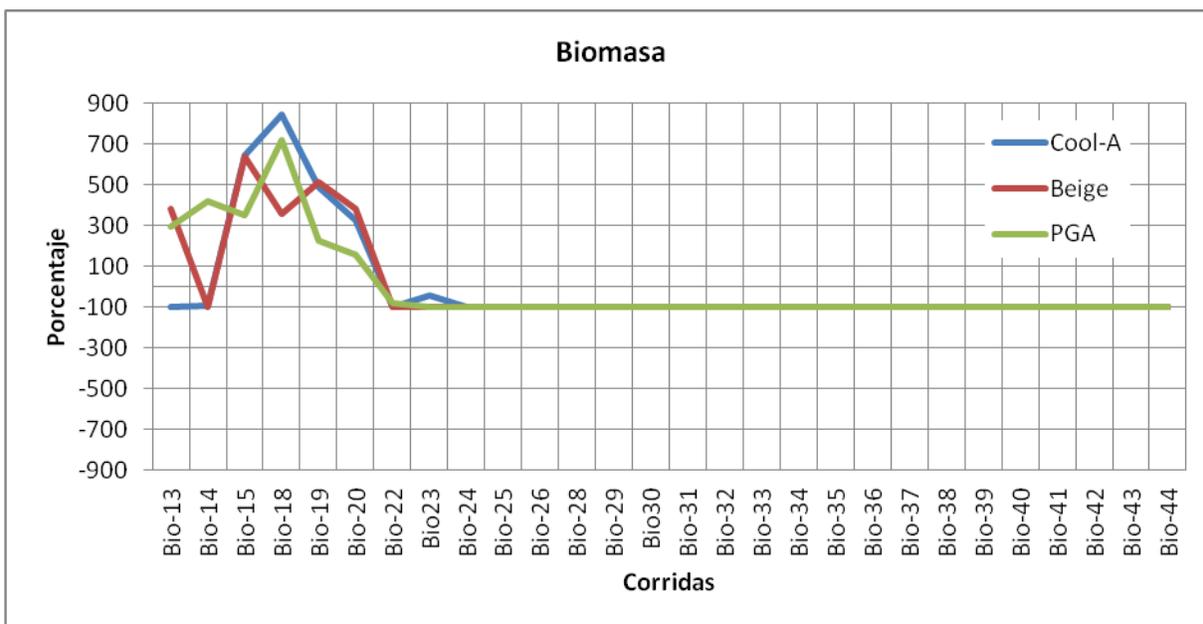


Figura 9.1 Gráficas de control generadas en la etapa 2.

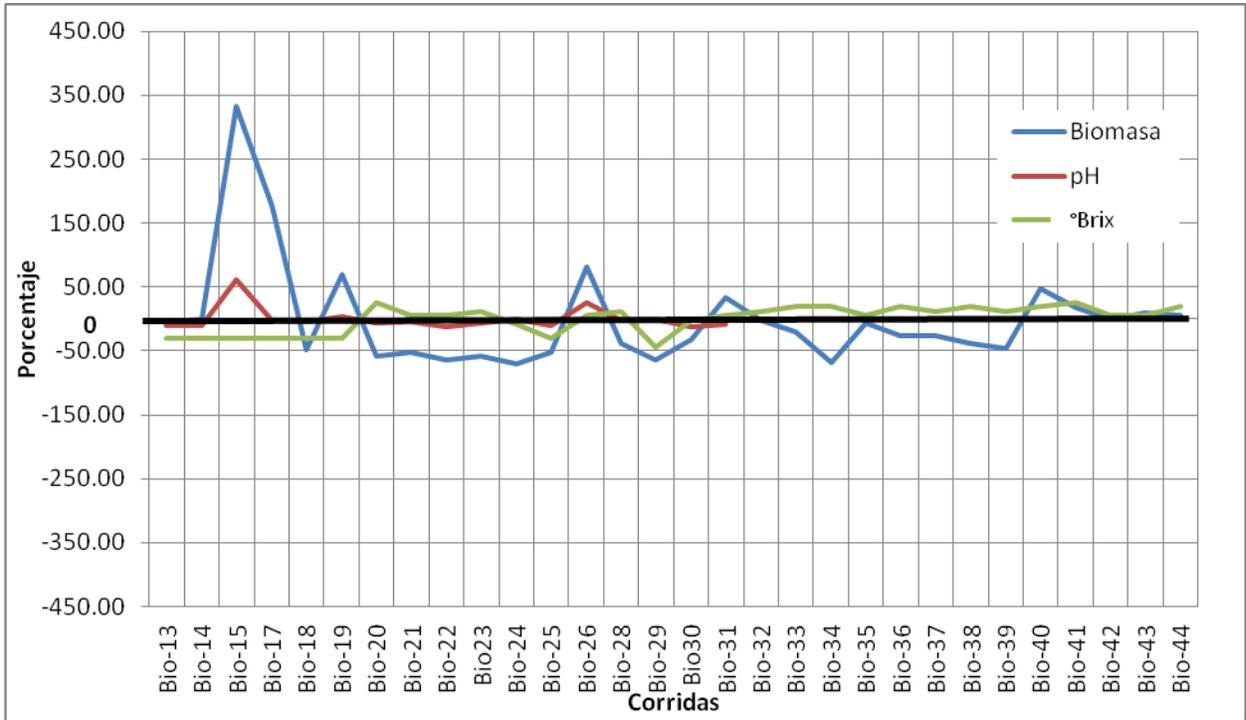


Figura 9.2. Gráficas de control generadas en la etapa 3.

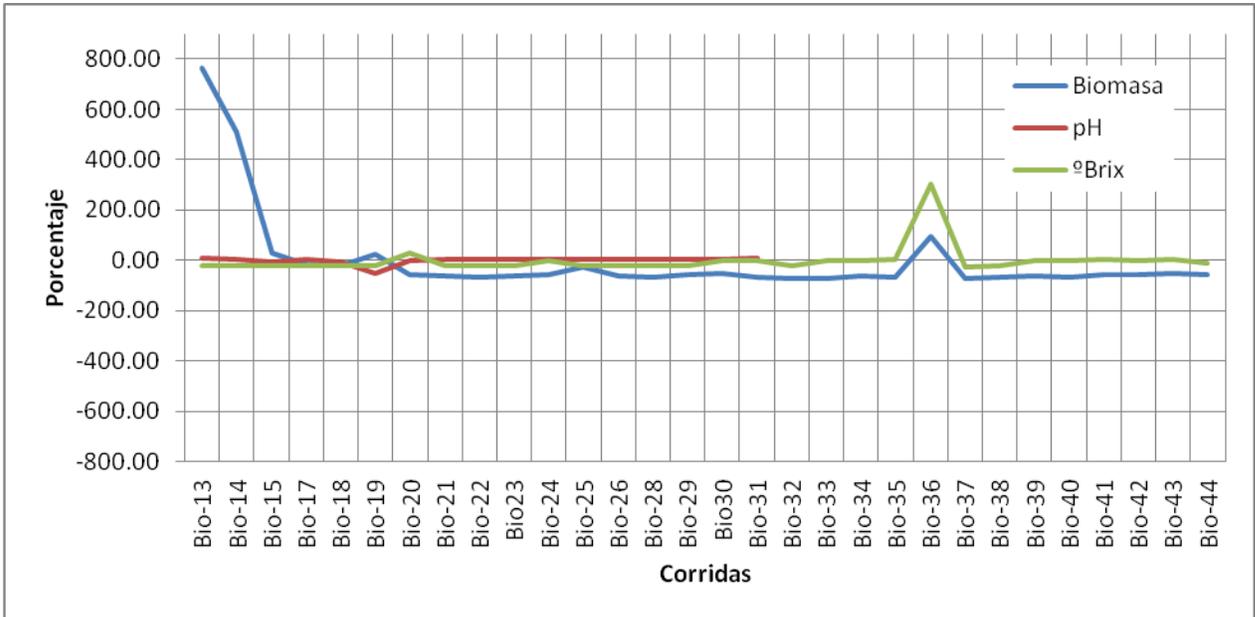
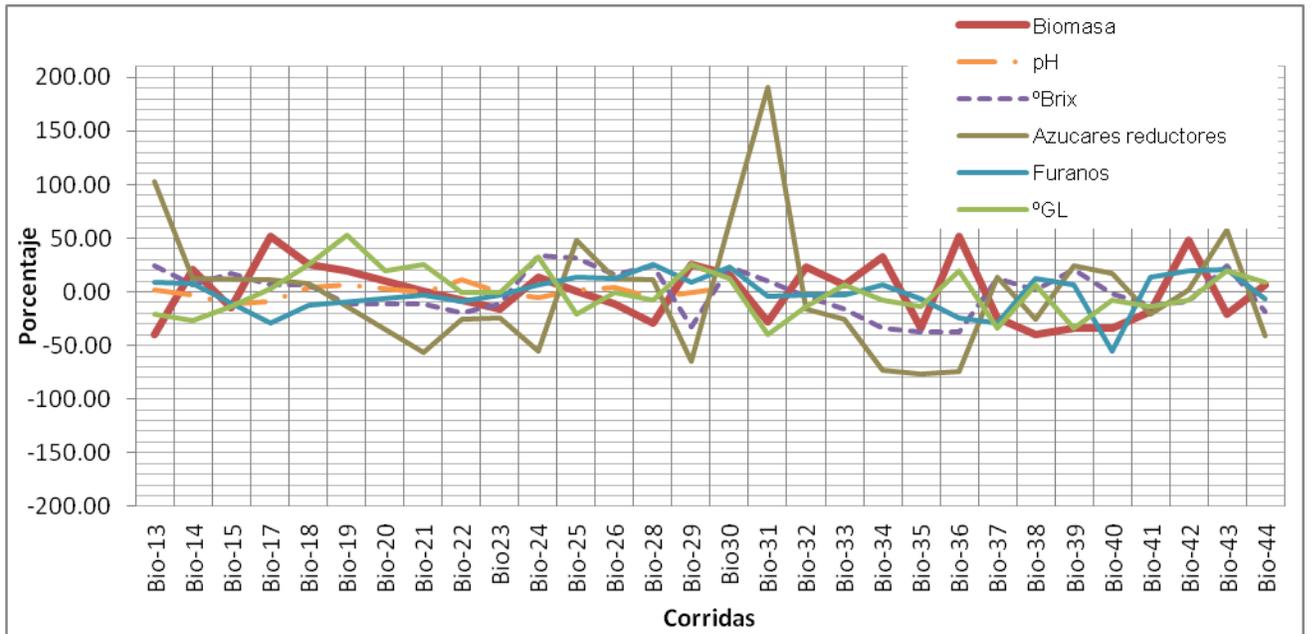
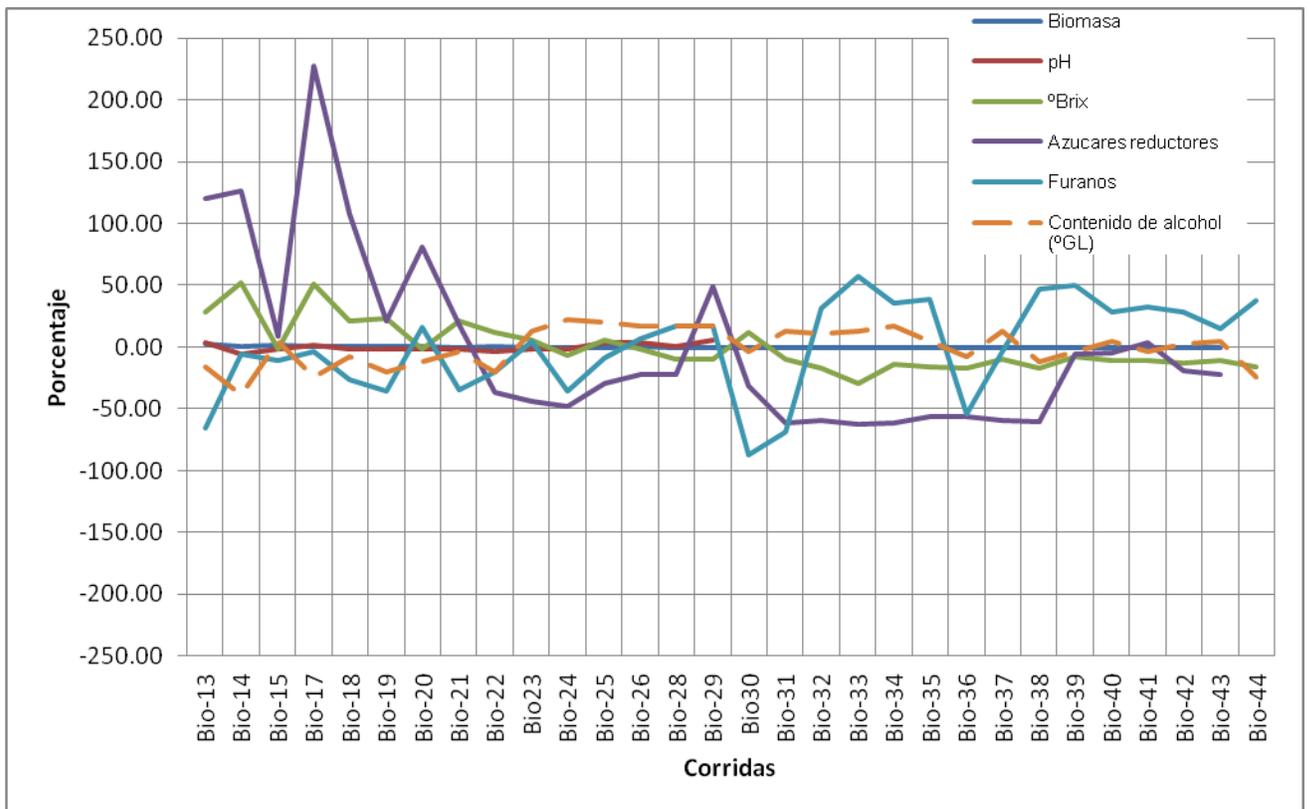


Figura 9.3. Gráficas de control generadas en la etapa 4.



Gráfica 9.4. Gráficas de control generadas en la etapa 5.



Gráfica 9.5. Gráficas de control generadas en la etapa 6.

Con los resultados generados se pretende que el personal a cargo de la producción del fermentador semilla, siga realizando las operaciones de manera ordenada, siguiendo los procedimientos, con la intención de aumentar el número de datos generados en las siguientes corridas y así establecer los rangos de permisibilidad con un mayor nivel de confianza los límites de control, que ayuden a mejorar las especificaciones del inoculante y como consecuencia la optimización del proceso de producción de alcohol en la última etapa fermentativa.

9.3.1 Determinación de los límites de control

Después de ajustar la variabilidad de los resultado en la producción del fermentador semilla, se determinaron los límites de control, tomando el +10% para el límite superior y el -10% para el límite inferior, con respecto a la media de cada variable de la producción, empleándose las corridas en donde se obtuvieron una concentración de alcohol igual o mayor de 5% v/v de alcohol. Estas corridas fueron las siguientes: Bio-23, Bio-24, Bio-25, Bio-26, Bio-28, Bio-29, Bio-31, Bio-32, Bio-33, Bio-34, Bio-35, Bio-37, Bio-40, Bio-43.

En la tabla 9.1, se muestran los límites superior e inferior y el valor medio de cada una de los valores de los parámetros evaluados en el proceso fermentativo, a la salida de cada una de las etapas.

Cuadro 9. 1. Valores del límite inferior y superior para cada variable del proceso.

Etapa	Variabes	Límite Superior	Valor medio	Límite inferior
Crecimiento en matraz	Beige (cel/mL)	3.34×10^{08}	3.04×10^{08}	2.74×10^{08}
	Cool-A (cel/mL)	1.27×10^{09}	1.15×10^{09}	1.04×10^{09}
	PGA (cel/mL)	3.15×10^{08}	2.86×10^{08}	2.57×10^{08}
Crecimiento en biorreactor de 7L	Biomasa (cel/mL)	6.80×10^{07}	6.18×10^{07}	5.56×10^{07}
	pH	4.38	3.98	3.58
	Sólidos solubles (°Brix)	1.62	1.47	1.32
Crecimiento en biorreactor de 70L	Biomasa (cel/mL)	2.17×10^{07}	1.97×10^{07}	1.77×10^{07}
	pH	8.56	7.78	7.00
	Sólidos solubles (°Brix)	1.22	1.11	1.00
Adaptación en biorreactor de 70L	Biomasa (cel/mL)	1.66×10^{08}	1.51×10^{08}	1.36×10^{08}
	pH	4.82	4.38	3.94
	Sólidos solubles (°Brix)	6.25	5.68	5.11
	Azúcares reductores (g/L)	34.06	30.96	27.86
	Furanos (mg/L)	126.84	115.31	103.78
	Contenido de alcohol (°GL)	15.87	14.43	12.99
Fermentación en biorreactor de 1000L	Biomasa (cel/mL)	3.94×10^{07}	3.58×10^{07}	3.22×10^{07}
	pH	4.54	4.13	3.72
	Sólidos solubles (°Brix)	6.60	6.00	5.40
	Azúcares reductores (g/L)	12.78	11.62	10.46
	Furanos (mg/L)	140.55	127.77	114.99

9.4 Determinación de las variables críticas de control

Las gráficas del anexo B, muestran el comportamiento de cada una de las variables del proceso de producción de inóculo respecto a la variable crítica de operación (contenido de alcohol), en el reactor de 1000 L.

De estas gráficas el grupo de trabajo conformado por el Dr. José Enrique Botello Álvarez, el Ing. Josué Grande Trejo y Laura Yuleni Ocaña Pérez determinaron por consenso que las variables que más impacto tienen en el rendimiento de producción de alcohol llevada a

cabo en la última etapa del proceso fermentativo son: la concentración celular, la concentración de furanos y de azúcares reductores. Estas se clasificaron como las variables críticas, ya que son condicionantes en el metabolismo de las levaduras, que si se salen de los límites de control pueden provocar que el rendimiento en la producción de alcohol en la última etapa disminuya. De éstas variables, la que se puede controlar durante el proceso de preparación del fermentador semilla es la cantidad de biomasa, ya que la concentración de furanos dependerá del control llevado a cabo en el proceso de cocimiento, mientras que la cantidad de azúcares reductores dependerá de la temporada en que sea cosechada la piña.

9.5 Elaboración de manuales

A partir de la metodología establecida, se procedió a la realización de manuales de procedimientos para la generación de inóculo, de las levaduras nombradas como Cool-A, Beige y PGA, para las etapas de resiembra en tubo, crecimiento en matraz, crecimiento en biorreactor de 7 L, crecimiento y adaptación en biorreactor de 70 L, así como para la etapa fermentativa en biorreactor de 1000 L; este manual lleva el título de “Manual de procedimientos para la generación de inóculo”, con código MPI-DYP-01. Además de un manual que indica la forma de operar los equipos involucrados en la generación de inóculo con el código MOE-DYP-01. Debido al convenio firmado de confidencialidad con la empresa, ambos manuales se encuentran bajo resguardo de la empresa DYPICURIAN S.A de C.V.

Además de los manuales mencionados anteriormente, se desarrollaron manuales para la toma de muestra y de análisis para el monitoreo del comportamiento de las levaduras a través de las distintas etapas de producción antes mencionadas, que llevan de manera respectiva el título de “Manual de toma de muestra” con código MTM-DYP-01 y “Manual de análisis de muestra” con código MAM-DYP-01. Estos manuales se muestran a continuación:

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	Código: MTM-DYP-01
	Laboratorio de Biotecnología	Rev: A
	Procedimiento para la toma de muestra en la generación de inóculo	

INTRODUCCIÓN

El presente manual integra los procedimientos para la correcta toma de muestra en las etapas involucradas en la generación de inóculo parte importante del proceso fermentativo para la elaboración de mezcal, producto elaborado por la empresa DYPICURIAN S.A de C.V.

La dirección general de la empresa establece con este manual las actividades que los operarios de las áreas de producción deben de realizar, con la finalidad de tener un monitoreo adecuado de los parámetros de control en la producción de inóculo, que aseguren un inoculante dentro de la variabilidad permitida y tener un rendimiento de alcohol del 5% v/v.

OBJETIVO DEL MANUAL

Establecer y estandarizar las actividades llevados a cabo en las tomas de muestra, en cada una de las etapas involucradas en el proceso de producción de inóculo.

ALCANCE

El procedimiento es aplicable a la gerencia de producción, así como a los responsables de las áreas involucradas en la producción de inóculo.

<i>Dypicurian</i>	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	Código: MTM-DYP-01
	Laboratorio de Biotecnología	Rev: A
	Procedimiento para la toma de muestra en la generación de inóculo	

A) Descripción del procedimiento

Proceso	Secuencia de etapas	Actividad
1. Crecimiento en matraz	1.0 Preparación de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limpiar el área de la mesa con cloruro de benzalconio. 2. Rotular con los nombres de cada una las cepas, 2 tubos por cepa. 3. Colocar 900 μL de agua destilada en cada uno de los tubos eppendorf. 4. Limpiarse las manos con alcohol de 70 °GL.
	2.0 Toma de muestra para conteo celular	<ol style="list-style-type: none"> 1. Homogenizar con movimientos circulares los matraces inoculados. 2. Colocar 100 μL del contenido de cada uno de los matraces a los respectivos tubos etiquetados 3. Agitar en el vortex cada una de las muestras diluidas durante 20 seg. 4. Agitar de nuevo en el vortex por 20 seg. 5. Realizar conteo celular en cámara de Neubauer. 6. Anotar el conteo celular de cada uno de los matraces en bitácora.
2. Crecimiento en fermentador de 7 L	1.2 Preparación y limpieza de materiales	<p>Lavar y secar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tubo Corning con capacidad de 15 mL. 2. Vaso de precipitado con capacidad de 100 mL. 3. Micropipetas de 1000 y 200 μL de capacidad. 4. Tubos eppendorf de 1000 μL de capacidad. 5. Puntas para las micropipetas de 20, 200, 1000 μL de capacidad.
	2.2 Toma de muestra a las 6 y 8 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumentar la agitación del biorreactor de 7 L a 200 rpm durante un tiempo de 15 minutos. 2. Purgar 50mL del contenido del biorreactor. 3. Aumentar la aireación nuevamente para tomar entre 7 y 10 mL de muestra, en un tubo Corning con capacidad de 15 mL. 4. Colocar la agitación a 100 rpm.

		5. Cerrar la manguera de toma de muestra.
	3.2 Realizar mediciones de variables	1. Realizar cuenta celular con cámara de Neubauer. 2. Determinar pH con potenciómetro debidamente calibrado. 3. Medir sólidos solubles con refractómetro.
3. Crecimiento en biorreactor de 70 L	1.3 Preparación y limpieza de materiales	Lavar y secar: 1. 1 vaso de precipitado de 250 mL 2. 1 tubo Corning de 50 mL. 3. Tubo eppendorf de 1000 µL
	2.3 Toma de muestra a las 6 y 8 h	1. Aumentar la agitación del biorreactor de 70L a 200 rpm durante un tiempo de 15 minutos. 2. Purgar 100 mL del contenido del biorreactor. 3. Colocar 20 mL de muestra en un tubo Corning. 4. Cerrar la válvula de toma de muestra.
	3.3 Realizar mediciones de variables	1. Realizar cuenta celular con cámara de Neubauer. 2. Determinar pH con potenciómetro debidamente calibrado. 3. Medir sólidos solubles con refractómetro.
4. Adaptación en biorreactor de 70 L	4.1 Preparación y limpieza de materiales	Lavar y secar: 1. Vaso de precipitado de 250 mL 2. Probeta graduada de 500 mL 3. Tubo Corning de 50 mL. 4. Tubos eppendorf de 1000 µL. 5. Tubos de ensaye de 20x150 6. Micropipetas y puntas para micropipetas.
	4.2 Toma de muestra 0, 12 y 36 h	1. Aumentar la agitación del biorreactor de 70L a 200 rpm durante un tiempo de 15 minutos. 2. Purgar 100 mL del contenido del biorreactor. 3. Colocar 20 mL de muestra en un tubo Corning. 4. Cerrar la válvula de toma de muestra.

	4.3 Realizar mediciones de variables	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar cuenta celular con cámara de Neubauer. 2. Determinar pH con potenciómetro debidamente calibrado. 3. Medir sólidos solubles con refractómetro. 4. Determinar concentración de azúcares reductores con el método DNS. 5. Determinar concentración de furanos. 6. Medir contenido de alcohol con alcoholímetro de varilla.
--	--------------------------------------	--

5. Producción de alcohol en fermentador de 1000 L	5.1 Preparación y limpieza de materiales	<ol style="list-style-type: none"> 1. Vaso de precipitado de 500 mL de capacidad. 2. Vaso de precipitado de 250 mL de capacidad. 3. Probeta graduada de 500 mL de capacidad. 4. Tubo Corning de 50 mL de capacidad. 5. Tubo para centrifuga.
	5.2 Toma de muestra 0, 24 y 36 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumentar la aireación durante un tiempo de 15 minutos. 2. Purgar 200 mL del contenido del biorreactor. 3. Colocar 100 mL de muestra en un vaso de precipitado. 4. Cerrar la válvula de toma de muestra.
	5.3 Mediciones de variables 0 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar cuenta celular con cámara de Neubauer. 2. Determinar pH con potenciómetro debidamente calibrado. 3. Medir sólidos solubles con refractómetro. 4. Determinar concentración de azúcares reductores con el método DNS. 5. Determinar concentración de furanos.
	5.4 Mediciones de variables 12 y 36 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar cuenta celular con cámara de Neubauer. 2. Determinar pH con potenciómetro debidamente calibrado. 3. Medir sólidos solubles con refractómetro. 4. Determinar concentración de azúcares reductores con el método DNS. 5. Determinar concentración de furanos. 6. Medir contenido de alcohol con alcoholímetro de varilla.

CONTROL DE EMISIÓN		
Elaboró	Revisó	Autorizó
Marcos F. Hernández Robles	Ing. Joaquín Grande T.	Ing. Raúl Castro C.

	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	Código: MAM-DYP-01
	Laboratorio de Biotecnología	Rev: A
	Procedimiento para el análisis de muestras tomadas en la generación de inóculo	

INTRODUCCIÓN

El presente manual integra los procedimientos para el análisis de las muestras tomadas en cada una de las etapas involucradas en la generación de inóculo parte importante del proceso fermentativo para la elaboración de mezcal, producto elaborado por la empresa DYPICURIAN S.A de C.V.

La dirección general de la empresa establece con este manual las actividades que los operarios de las áreas de producción deben de realizar, con la finalidad de tener un monitoreo adecuado de los parámetros de control en la producción de inóculo, que aseguren un inoculante dentro de la variabilidad permitida y tener un rendimiento de alcohol del 5% v/v.

OBJETIVO DEL MANUAL

Establecer y estandarizar las actividades llevados a cabo en los análisis de las tomas de muestra, en cada una de las etapas involucradas en el proceso de producción de inóculo.

ALCANCE

El procedimiento es aplicable a la gerencia general de producción, así como a los responsables de las áreas involucradas en la producción de inóculo.

Proceso	Secuencia de etapas	Actividad
1. Concentración celular	1.0 Preparación de muestra	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agitar la muestra tomada durante 20 segundos, en el vortex. 2. Tomar 10 µL de la muestra y colocar sobre una de las cámaras de Neubauer. 3. Repetir el paso 2 para la otra cámara de Neubauer. 4. Poner un cubreobjetos, cubriendo ambas cámaras.
	2.0 Cuenta celular	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar y asegurar la cámara de Neubauer sobre la platina o plataforma del microscopio. 2. Emplear el objetivo 10X y observar por el ocular enfocando la cámara de Neubauer, hasta diferenciar las levaduras. 3. Realizar la cuenta de las levaduras en los 5 cuadros que conforman la cámara. 4. Determinar la concentración celular por mililitro, de acuerdo a la siguiente ecuación: $\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de cuadros contados}} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$
2. Determinación de pH	2.1 Calibración del potenciómetro	<ol style="list-style-type: none"> 1. Verter agua destilada a chorro con una pizeta, alrededor del electrodo del potenciómetro y secar. 2. Introducir electrodo en el frasco de la solución patrón de pH 4 y presionar el botón “standardize”. Esperar a que la pantalla indique un pH de 4 y presionar el botón “enter”. 3. Lavar el electrodo con agua destilada de la pizeta y secar. 4. Introducir el electrodo en el frasco de la solución patrón de pH 7 y presionar el botón “standardize”. Esperar a que la pantalla indique el 7 esperado y presionar el botón “enter”. Lavar el electrodo con agua destilada de la pizeta y secar.
	2.2 Preparación de muestra y lectura de pH.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agitar la muestra tomada durante 20 segundos, en el vortex. 2. Colocar la muestra en un vaso de precipitado. 3. Situar el electrodo en la muestra, esperar a que se estabilice y registrar la lectura.
3. Determinación de sólidos solubles	3.1 Calibración del refractómetro	<ol style="list-style-type: none"> 1. Limpiar la cámara del refractómetro digital, con agua destilada y secar. 2. Encender el refractómetro. 3. Llenar la cámara de muestreo con agua destilada. 4. Realizar la lectura, que debe ser 0.

	3.2 Preparación de muestra y lectura de sólidos solubles.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agitar la muestra tomada durante 20 segundos, en el vortex. 2. Colocar una parte de la muestra en el prisma del refractómetro y registrar la lectura en °Brix.
4. Concentración de furanos	4.1 Preparación de la muestra	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agitar durante 20 segundos, en el vortex, la muestra previamente centrifugada, a la que se le tomará lectura. 2. Colocar la muestra agitada en un vaso de precipitado de 50 mL. 3. Etiquetar 3 tubos de ensaye y realizar una dilución 1:50 de la muestra por triplicado.
	4.2 Lectura de furanos en espectrofotómetro	<ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionar una longitud de onda de 284 nm y de 320 nm. 2. Limpiar las celdas de cuarzo cuidadosamente y colocar agua destilada como solución patrón. 3. Calibrar el espectrofotómetro con la solución patrón. 4. Proceder a realizar las lecturas de las muestras problema y registrarlas en bitácora.
	4.3 Calculo la concentración de furanos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Calcular el promedio de las tres muestras problemas. 2. Determinar la concentración de furanos de acuerdo a la siguiente expresión: $\frac{mg}{L} \text{ Furanos} = \frac{(X_{284} - X_{320}) - 0.06}{0.141} \times \text{Factor de dilución}$
5. Concentración de azúcares reductores	5.1 Preparación de la muestra	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agitar la muestra tomada durante 20 segundos, en el vortex. 2. Colocar la muestra agitada en un vaso de precipitado de 50 mL. 3. Etiquetar 1 tubo de ensaye y realizar la dilución 1:150 de la muestra por triplicado.
	5.2 Lectura en espectrofotómetro	<ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionar una longitud de onda de 535 nm. 2. Limpiar las celdas de cuarzo cuidadosamente y colocar agua destilada como solución patrón. 3. Calibrar el espectrofotómetro con la solución patrón. 4. Proceder a realizar las lecturas de las muestras problema y registrarlas en bitácora.

	5.3 Calculo la concentración de azúcares reductores	<ol style="list-style-type: none"> 1. Calcular el promedio de las lecturas de las tres muestras problemas. 2. Determinar la concentración de azúcares reductores en g/L de acuerdo a la expresión generada de la curva de calibración.
6. Concentración de alcohol	6.1 Montaje del equipo de destilación.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar los 500 mL de muestra tomada, en un matraz balón. 2. Situar el matraz balón sobre una chaqueta de calentamiento. 3. Ensamblar con cuidado el condensador y colocar las mangueras para el agua de enfriamiento.. 4. Colocar una probeta de 100 mL de capacidad debajo del condensador.
	6.2 Medición del contenido de alcohol	<ol style="list-style-type: none"> 1. Después de tener 100 mL de destilado en la probeta, se procede a sumergir el alcoholímetro de varilla. 2. Hacerlo girar en el producto destilado y registrar la lectura en °GL.

CONTROL DE EMISIÓN		
Elaboró	Revisó	Autorizó
Marcos F. Hernández Robles	Ing. Joaquín Grande T.	Ing. Raúl Castro C.

9.6 Variabilidad de la materia prima

En las figuras 9.1 y 9.2 se observan de manera parcial, la mejor época del año para la cosecha de piña de *Agave salmiana*, con vías a la mejora del rendimiento en concentración de azúcares reductores para la producción de alcohol.

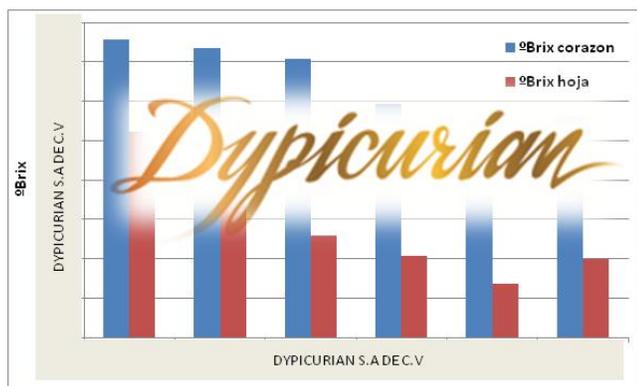


Figura 9.1. Cambio del contenido de sólidos solubles (°Brix) con respecto al tiempo

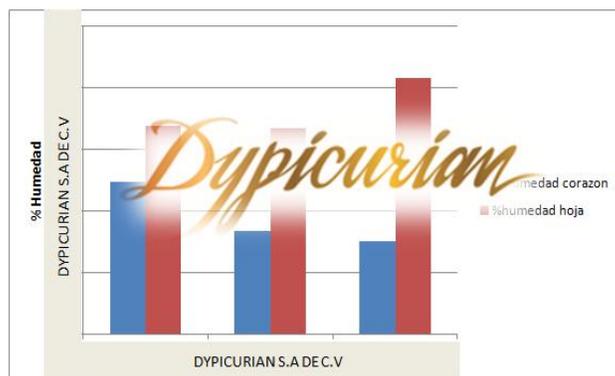


Figura 9.2. Cambio del contenido del porcentaje de humedad con respecto al tiempo

10.CONCLUSIONES

Con la elaboración de los diagramas de operación se logró conocer cada una de las etapas involucradas y las condiciones con que se lleva a cabo el proceso, esto dio pauta para realizar un mejor monitoreo y control en la producción de inóculo, ya que anteriormente por desconocimiento o por omisión en el control de las condiciones de operación el rendimiento en la producción de mezcal no era el esperado.

Se lograron realizar las gráficas de control donde se observa el comportamiento de las variables evaluadas en cada una de las etapas de producción de inóculo. En cada una de estas gráficas (figura 9.1 a la figura 9.5) se pudo observar que en las primeras corridas la variabilidad es alta en comparación a la media y conforme se realizaron más corridas la variabilidad se ajusta a un rango de valores, esto se logró eliminando los errores humanos más frecuentes que se cometían en el proceso.

Se consiguió establecer la variable crítica de control en el proceso de producción de inóculo, esto a partir del análisis de las gráficas de respuesta de las variables del proceso contra la variable crítica del proceso (contenido de alcohol), observándose que la principal variable a controlar es la producción de biomasa en las etapas 3 y 4 de la producción de inóculo.

A partir de lo anterior se logró elaborar los manuales de producción de inóculo, donde se establecieron las actividades que se deben realizar para obtener un inoculante dentro de la variabilidad permitida, eliminando los vicios que provocaban bajos rendimientos de alcohol en la última etapa fermentativa. Todo esto ayudó a mejorar el rendimiento de la producción de alcohol llegando a obtener hasta 29 °G.L.

Se consiguió realizar el estudio de humedad y sólidos solubles de la piña de *Agave salmiana* durante 6 meses. Aunque se necesita un mayor número de datos a lo largo del año para establecer la mejor época de cosecha en donde el agave contenga mayor concentración de azúcares, con el fin de mejorar el proceso fermentativo.

Por último, el introducir bases ingenieriles a un proceso de producción artesanal como es el mezcal, es un reto ya que se necesita conocer el comportamiento de cada etapa de la producción, para identificar los

11.BIBLIOGRAFÍA

- Arancibia, M. 2012. Denominación de origen del mezcal. Revista Club CICML **16** (3): **51**.
- Ávila, J. A. 2010. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del mezcal de Durango para el desarrollo de un índice de calidad. Trabajo de tesis. Instituto Politécnico Nacional. México. p. 21-24.
- Barragán, L. 2002. Proyecto de inversión para el procesamiento de agave mezcalero en la mixteca comiteca. Proyecto de tesis. Universidad Tecnológica Mixteca Oaxaca, México. p. 18-26.
- Bautista, J. M., García L., Barboza J. E. y Parra L. A. 2001. El Agave Tequilana Weber y la Producción de Tequila. Acta Universitaria **11** (2): 21-26.
- Botello B. E. 2009. Producción nacional de mezcal, superior a dos millones de litros. En línea: http://www.cronica.com.mx/nota.php?id_nota=416171. Fecha de consulta: Abril 2012.
- Cabiedes, L. 2008. Propuesta de estrategia mercadológicas para elevar el nivel de posicionamiento en México del mezcal producido en el estado de Oaxaca. Trabajo de tesis. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. p. 14-17.
- Cardona, M. 2011. Tendrá Instituto Tecnológico de Celaya planta de mezcal. En línea: <http://www.am.com.mx/Nota.aspx?ID=514643>. Fecha de consulta: Abril de 2012.
- Cedeño, C. M. 1995. 15. Tequila Production. Critical Reviews in Biotechnology **15**: 1-11.
- CONAPO. 2010. Marginación de las localidades. México. p. 26. En línea: <http://www.conapo.gob.mx/publicaciones/marginalocal2010/documentoprincipal/Capitulo03.pdf>. Fecha de consulta: Abril 2012.
- Dewick, P. M. 1994. Isoflavonoids. In: The Flavonoids: Advances in Research since 1986. Ed. Harborne. Londres. Chapman and Hall. p. 116
- Dewick, P. M. 1994. Isoflavonoids. The Flavonoids: Advances in research since 1986. Ed. Harborne, J. B.). London. Chapman and Hall. p. 116.
- Doran, M. P. 1998. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Acribia. España. p. 362-365.
- Eguiarte, L.E., V. Souza, and A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 66: 131-150.
- Escalante, P.; Blaschek, H. P.; Barba, A. P.; Santos, L. y Leon A. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of Agave salmiana. The society for Applied Microbiology 46: 626.

Franck A. Inulin. En: Food Polysaccharides and Their Applications. Stephen A. (Editor). Segunda Edición. Nueva York, USA: Marcel Dekker; 2006. p. 733.

García, A. y Galván, R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 56: 7.

Hernández, P.A. 2003. Microbiología industrial. Editorial EUNED. Chile. pp. 36-61.

INEGI. 2011. Perspectiva estadística Guanajuato. México. p. 54.

Jiménez, M. A. 2009. Identificación y cuantificación de algunos alcoholes en la destilación del mezcal obtenido de *Agave potatorum* zucc. Universidad Tecnológica Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México. p. 1-12.

Lorenzo, T., y Cornejo, B. (1997). Los Componentes Volátiles Responsables del Aroma en el Vino. *Bebidas Mexicanas*. 5 (7):30-33.

Madigan, T. M., Martinko J. M. y Parker J. 1997. *Biology of microorganism*. Eighth Edition. Prentice Hall. USA. p. 377.

Mancilla. N.A., Martínez M. L. y López M. G. 1999. Maillard compounds generated during thermal process of *Agave tequilana* L. Weber var. azul. En línea: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0110295> . Fecha de consulta: Noviembre de 2010.

Martínez del Río, C., Eguiarte, L.E. 1987. Bird Visitation to *Agave Salmiana*: Comparisons among hummingbirds and perching birds. *The Condor* 89: 357-363.

Melero, R. 1992. Fermentación controlada y Selección de levaduras vínicas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 32 (4): 379

Michel, C. 2007. Caracterización cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Trabajo de tesis. Instituto Politécnico nacional. p.2.

Molina, J. A., Botello, J. E., Estrada A., Navarrete J.L., Jiménez H., Cárdenas M., Rico. 2007. Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6 (1): 48.

Morales, R. 2008. Ingeniería básica de una planta para la industria del mezcal en Mitla, Tlacolula, Oaxaca. Trabajo de Tesis. Instituto Politécnico Nacional. p 16-19.

Morales, N., Escobar, D. y Paredes, E. 2007. Estudio sobre el impacto que las modificaciones a la NOM-070-SCFI-1994 traerán a la industria del mezcal. Trabajo de tesis. Universidad Autónoma de Chapingo. p 29.

Navarrete B., Jiménez J. L., Botello E., Rico R. 2003. Mixed Culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2206-2211.

NOM-006-SCFI-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.

NOM-030-SCFI-2006. Norma Oficial Mexicana: Información comercial. Declaración de cantidad en la etiqueta. Especificaciones

NOM-070-SCFI-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.

NOM-120-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana: Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-142-SSA1-1995. Norma Oficial Mexicana: Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

Prat, B. et al. 1999. Métodos estadísticos control y mejora de la calidad. Primera edición. Alfa Omega. México. p. 47-49.

Ramales, M. y Ortiz E. 2006. Proceso de elaboración de mezcal. Bebidas. Alfa Editores Técnicos. Universidad Tecnológica Mixteca. p. 28-30.

Rico, B. F. (1995). El Tequila, una Bebida Mexicana de Fama Internacional. *Bebidas Mexicanas* 4(1) 14.

Riu, J. 2006. Gráficos de control de Shewhart. Grupo de quimiometría, cualimetría y nanosensores. Universitat Rovira I Virgili. En línea: http://argo.urv.es/quimio/general/grafics_de_control.pdf (fecha de consulta: Abril 2012).

Sarmiento A., Herrera J. 2003. Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (microbiología industrial). Pontificia universidad Javeriana. Bogotá. p. 103.

Schaffer, W. M., y Schaffer, M. V. 1977. The reproductive biology of Agavaceae: I. Pollen and Nectar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist*, **22**(2):157-168.

Tafolla, Humberto. 2000. Estandarización y Globalización. *Revista SEGMENTO* **6** (2). Instituto Autónomo de México. p. 6.

Téllez, M. P. 1998. El cocimiento una etapa importante en la producción del Tequila. *Bebidas mexicanas* **7** (1) p. 19

Vargas, G. C. 2009. Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*). Trabajo de tesis. Instituto Politécnico Nacional. p 19-21.

Vázquez, H. J. y Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Redalyc Rev. Ingeniería, investigación y tecnología* 7 (4): 252

Vázquez, H.J. y Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 8(4), 249-259.

Villamil Y., Zapata Y. 1999. Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. Trabajo de grado (Microbiología industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. p. 46.

Voet, D. et al. 1995. *Biochemistry*. Segunda Edición. John Wiley & Sons, Inc. USA. p.444.

12.ANEXOS

Anexo A. Datos generados durante las etapas monitoreadas en la preparación del fermentador semilla

Etapa	2						4			5			7						8					
	Cool-A Biomasa (cel/ml)	Beige Biomasa (cel/ml)	PGA Biomasa (cel/ml)	Cool-A Biomasa (cel/ml)	Beige Biomasa (cel/ml)	PGA Biomasa (cel/ml)	Biomasa final(cel/ml)	%Brix	pH	Biomasa (cel/ml)	%Brix	pH	Biomasa final (cel/ml)	%Brix	pH	Azúcares. Reduct. (g/l)	Furanos (mg/l)	%GL	Biomasa (cel/ml)	%Brix	pH	Azúcares. Reduct. (g/l)	Furanos (mg/l)	%GL
Bio-13	3.00E+08	1.85E+11	3.30E+11	2.75E+08	3.80E+08	2.25E+08	7.10E+07	1.0	3.6	4.40E+08	1.0	8.0	9.50E+07	7.0	4.5	61.94	126.87	12.0	1.34E+08	8.5	4.2	42.58	39.75	20.0
Bio-14	3.35E+09	2.85E+08	4.40E+11	4.25E+08	2.60E+08	3.70E+08	7.40E+07	1.0	3.6	3.10E+08	1.0	7.7	1.92E+08	6.0	4.3	34.48	124.80	11.0	6.25E+07	10.1	3.8	43.80	109.65	14.5
Bio-15	3.06E+11	2.84E+11	3.80E+11	2.00E+08	1.97E+08	2.55E+08	3.20E+08	1.0	6.4	6.65E+07	1.0	7.1	1.36E+08	6.6	3.9	s/d	s/d	13.0	1.16E+08	6.5	4.0	21.11	103.67	25.0
Bio-17	s/d	s/d	s/d	1.65E+08	1.80E+08	1.45E+08	2.05E+08	1.0	3.9	4.25E+07	1.0	7.6	2.40E+08	6.0	4.0	34.21	81.70	15.5	4.65E+07	10.0	4.1	63.45	111.88	18.0
Bio-18	3.87E+11	1.76E+11	6.90E+11	2.00E+08	2.55E+08	2.75E+08	3.80E+07	1.0	3.8	4.10E+07	1.0	7.1	2.00E+08	6.0	4.6	33.03	101.56	19.0	6.20E+07	8.0	4.0	s/d	86.33	22.0
Bio-19	2.40E+11	2.35E+11	2.75E+11	1.18E+08	1.96E+08	3.00E+08	1.25E+08	1.0	4.1	6.22E+07	1.0	3.6	1.90E+08	5.0	4.7	s/d	s/d	23.0	7.50E+07	8.2	4.0	40.29	75.28	19.0
Bio-20	1.75E+11	1.85E+11	2.15E+11	1.80E+08	1.35E+08	2.35E+08	3.10E+07	1.8	3.7	2.10E+07	1.6	7.3	s/d	s/d	s/d	s/d	18.0	s/d	6.5	4.0	23.51	135.09	21.0	
Bio-21	1.35E+08	1.78E+08	1.69E+08	s/d	s/d	s/d	3.57E+07	1.5	3.8	2.00E+07	1.0	7.8	1.60E+08	5.0	4.4	13.34	112.47	19.0	5.70E+07	8.0	4.0	35.02	76.02	23.0
Bio-22	1.48E+08	1.50E+08	1.78E+10	1.70E+08	1.55E+08	1.80E+08	2.70E+07	1.5	3.5	1.70E+07	1.0	7.7	s/d	4.5	4.9	22.96	105.87	15.0	2.80E+07	7.4	3.9	22.90	92.92	19.0
Bio-23	2.40E+10	2.70E+08	2.75E+08	1.50E+08	1.61E+08	2.75E+08	3.10E+07	1.6	3.7	2.00E+07	1.0	7.7	1.34E+08	5.0	4.4	23.00	113.29	15.0	7.50E+07	7.0	4.0	12.33	121.41	27.0
Bio-24	2.25E+08	2.60E+08	2.20E+08	1.70E+08	1.55E+08	2.40E+08	2.25E+07	1.3	4.0	2.30E+07	1.2	7.9	1.80E+08	7.5	4.2	13.82	124.18	20.0	3.50E+07	6.2	4.0	10.78	74.50	29.0
Bio-25	2.75E+08	2.05E+08	2.30E+08	1.05E+08	1.70E+08	2.25E+08	3.50E+07	1.0	3.6	3.85E+07	1.0	7.6	1.60E+08	7.4	4.5	45.22	132.48	12.0	3.80E+07	7.0	4.2	10.09	106.38	28.5
Bio-26	2.30E+08	2.75E+08	2.10E+08	2.00E+08	2.40E+08	s/d	1.35E+08	1.5	5.0	1.90E+07	1.0	7.8	1.40E+08	6.5	4.6	34.47	130.99	15.0	3.55E+07	6.5	4.2	13.60	124.43	28.0
Bio-28	2.65E+08	3.00E+08	2.65E+08	2.80E+08	2.60E+08	2.25E+08	4.60E+07	1.6	3.9	1.65E+07	1.0	7.7	1.13E+08	7.0	4.2	33.92	145.78	14.0	4.40E+07	6.0	4.1	14.99	136.52	28.0
Bio-29	1.19E+08	1.28E+08	1.33E+08	1.65E+08	1.25E+08	1.30E+08	2.70E+07	0.8	4.0	2.30E+07	1.0	7.8	2.00E+08	3.8	4.4	10.74	126.92	19.0	2.40E+07	6.0	4.3	14.99	136.52	28.0
Bio-30	2.25E+08	2.15E+08	2.25E+08	1.90E+08	2.90E+08	2.15E+08	5.05E+07	1.4	3.5	2.35E+07	1.2	7.7	1.85E+08	6.9	4.6	50.61	143.23	17.0	1.10E+07	7.4	s/d	28.91	14.33	23.0
Bio-31	3.05E+08	2.85E+08	2.90E+08	3.50E+08	3.40E+08	2.75E+08	9.90E+07	1.5	3.6	1.75E+07	1.2	8.0	1.14E+08	6.2	s/d	88.92	110.67	9.0	4.00E+07	6.0	s/d	13.30	35.99	27.0
Bio-32	3.65E+08	3.85E+08	3.15E+08	3.55E+08	4.25E+08	3.15E+08	7.25E+07	1.6	s/d	1.50E+07	1.0	s/d	1.95E+08	5.4	s/d	25.88	112.77	13.0	2.25E+07	5.5	s/d	7.55	153.69	26.5
Bio-33	3.80E+08	4.00E+08	3.45E+08	3.50E+08	4.35E+08	3.95E+08	5.90E+07	1.7	s/d	1.40E+07	1.2	s/d	1.70E+08	4.7	s/d	22.91	112.91	16.0	4.10E+07	4.7	s/d	7.84	183.55	27.0
Bio-34	4.00E+08	3.85E+08	3.90E+08	3.90E+08	3.50E+08	2.10E+08	2.35E+07	1.7	s/d	1.90E+07	1.2	s/d	2.10E+08	3.7	s/d	8.40	123.69	14.0	3.65E+07	5.7	s/d	7.35	157.73	28.0
Bio-35	3.80E+08	3.55E+08	4.20E+08	3.95E+08	4.00E+08	3.75E+08	6.90E+07	1.5	s/d	1.70E+07	1.3	s/d	1.05E+08	3.5	s/d	7.04	107.80	13.0	2.90E+07	5.6	s/d	7.43	161.67	25.0
Bio-36	2.65E+08	2.85E+08	2.30E+08	2.40E+08	2.60E+08	2.60E+08	5.50E+07	1.7	s/d	1.00E+08	5.0	s/d	2.40E+08	3.5	s/d	7.79	88.44	18.0	2.25E+07	5.5	s/d	8.48	53.37	22.0
Bio-37	3.50E+08	3.05E+08	3.20E+08	3.20E+08	3.10E+08	3.05E+08	5.45E+07	1.6	s/d	1.35E+07	0.9	s/d	1.20E+08	6.3	s/d	34.94	81.70	10.0	2.05E+07	6.0	s/d	8.56	112.41	27.0
Bio-38	3.25E+08	2.60E+08	3.05E+08	2.65E+08	3.40E+08	2.90E+08	4.60E+07	1.7	s/d	1.80E+07	1.0	s/d	9.50E+07	5.7	s/d	22.68	130.14	16.0	3.80E+07	5.5	s/d	7.91	171.67	21.0
Bio-39	4.20E+08	2.25E+08	3.85E+08	3.95E+08	4.05E+08	3.70E+08	3.95E+07	1.6	s/d	1.90E+07	1.2	s/d	1.05E+08	6.8	s/d	38.11	123.40	10.0	2.55E+07	6.1	s/d	7.67	174.52	23.0
Bio-40	4.05E+08	4.10E+08	4.00E+08	4.35E+08	4.05E+08	3.50E+08	1.10E+08	1.7	s/d	1.65E+07	1.2	s/d	1.05E+08	5.5	s/d	36.07	51.53	14.0	2.95E+07	5.9	s/d	18.20	150.25	25.0
Bio-41	3.75E+08	4.10E+08	3.80E+08	4.95E+08	3.70E+08	3.60E+08	8.70E+07	1.8	s/d	2.25E+07	1.3	s/d	1.30E+08	4.9	s/d	24.37	131.84	13.0	3.25E+07	5.9	s/d	18.42	154.86	23.0
Bio-42	3.95E+08	3.70E+08	3.75E+08	3.65E+08	3.65E+08	3.95E+08	7.45E+07	1.5	s/d	2.10E+07	1.2	s/d	2.35E+08	5.1	s/d	31.30	138.26	14.0	3.35E+07	5.8	s/d	20.02	149.89	24.5
Bio-43	3.95E+08	4.00E+08	3.00E+08	4.05E+08	3.85E+08	3.55E+08	8.15E+07	1.5	s/d	2.60E+07	1.3	s/d	1.25E+08	7.0	s/d	48.11	139.68	18.0	3.10E+07	5.9	s/d	15.62	133.72	25.0
Bio-44	3.80E+08	3.45E+08	3.50E+08	3.95E+08	3.60E+08	3.65E+08	7.80E+07	1.7	s/d	2.30E+07	1.1	s/d	1.70E+08	4.6	s/d	18.22	108.16	16.5	3.40E+07	5.6	s/d	15.08	160.36	18.0

*s/d Sin datos

Anexo B. Gráficas del comportamiento de las variables del proceso respecto a la variable crítica (contenido de alcohol) en fermentador de 1000 L.

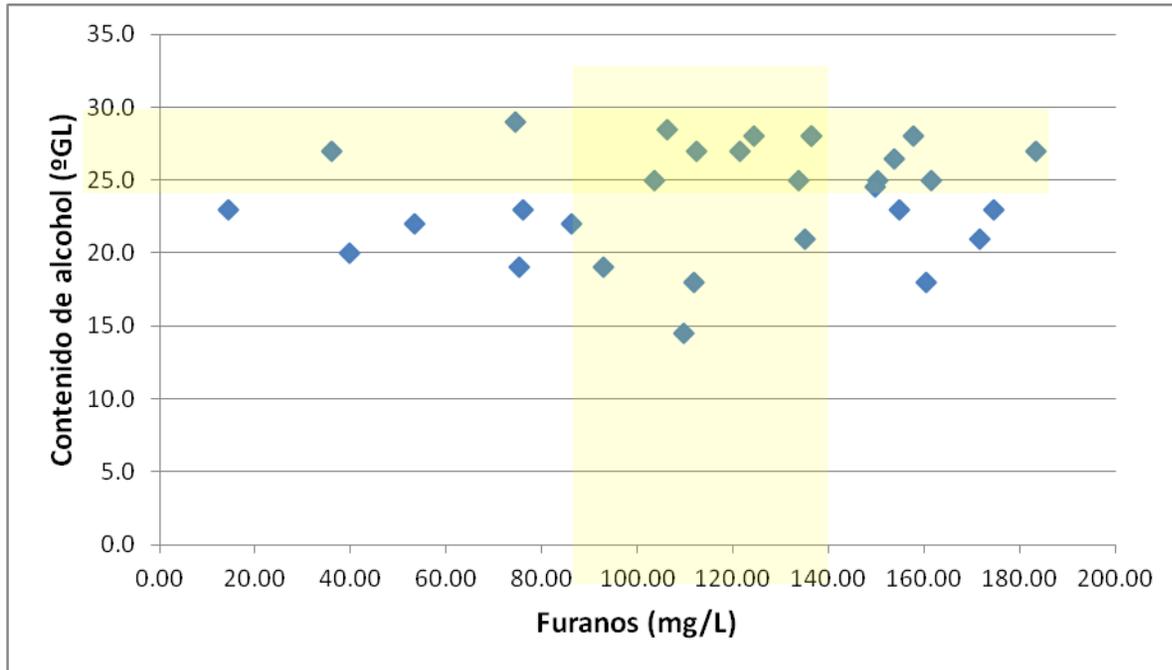


Figura 1B. Gráfica de respuesta del contenido de alcohol en función de la concentración de furanos.

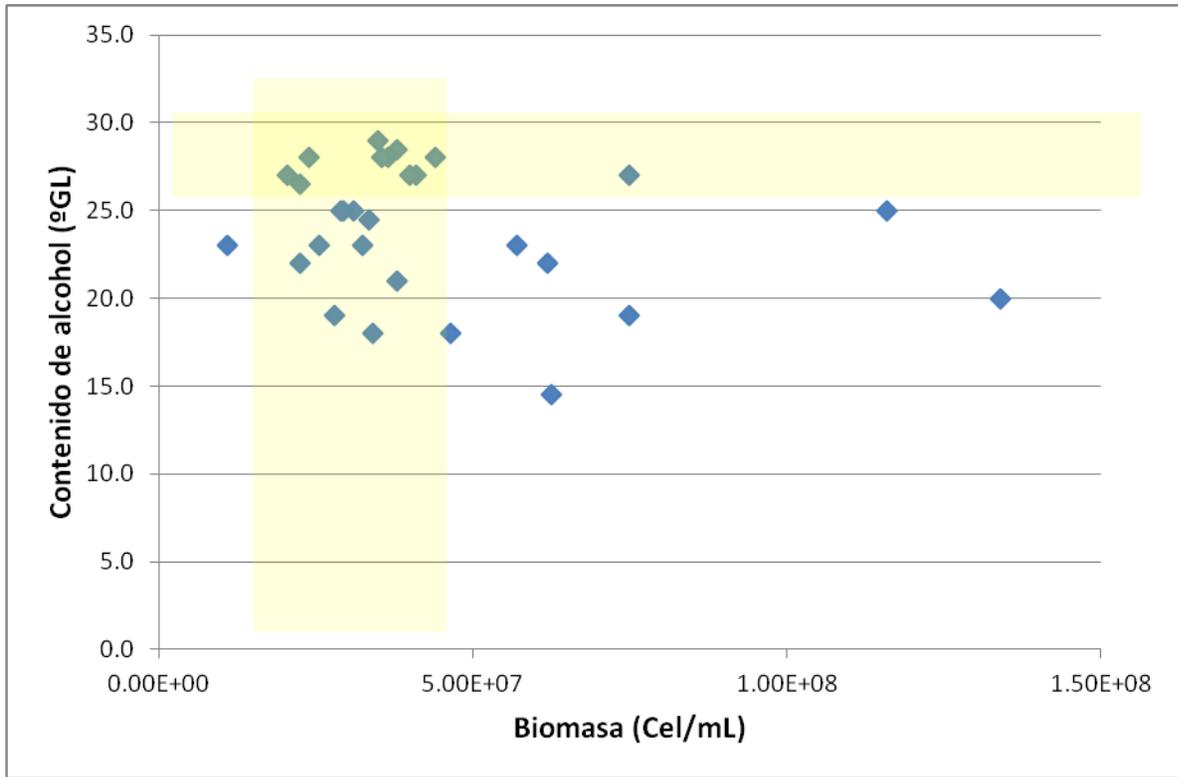


Figura 2B. Gráfica de respuesta del contenido de alcohol en función de la densidad celular.

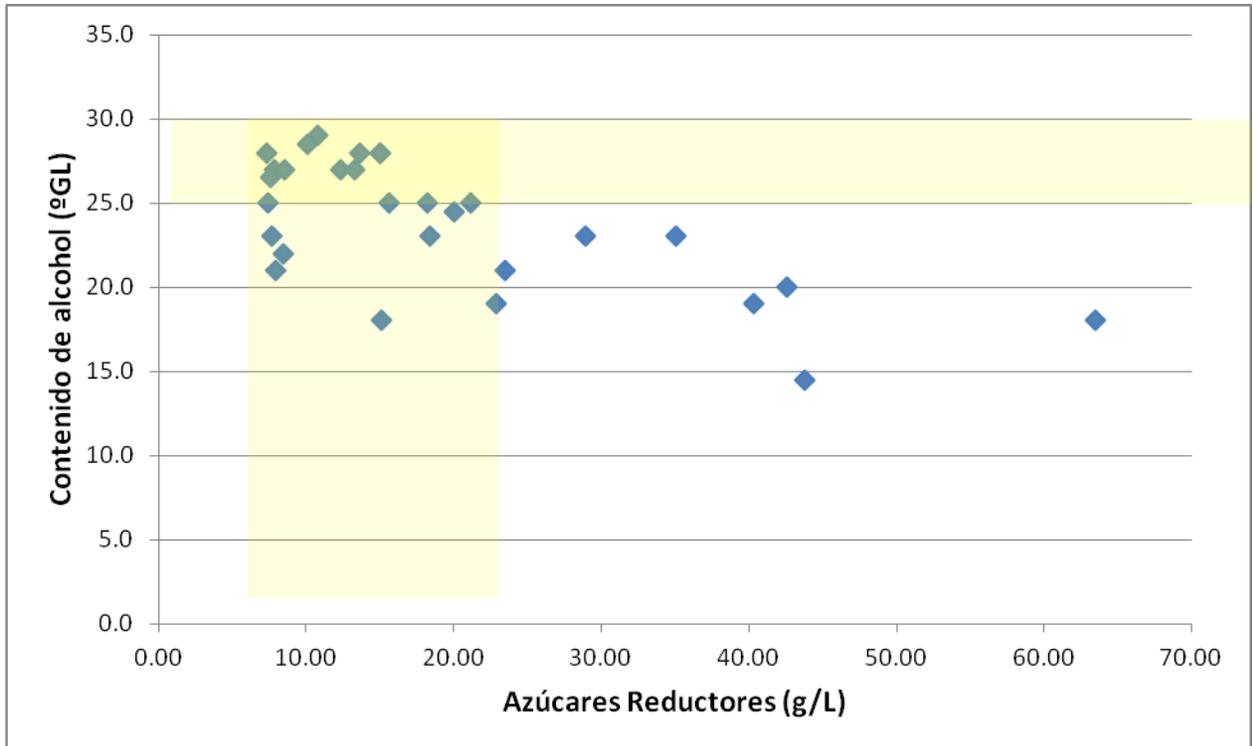


Figura 3B. Gráfica de respuesta de contenido de alcohol en función de la concentración de azúcares reductores.

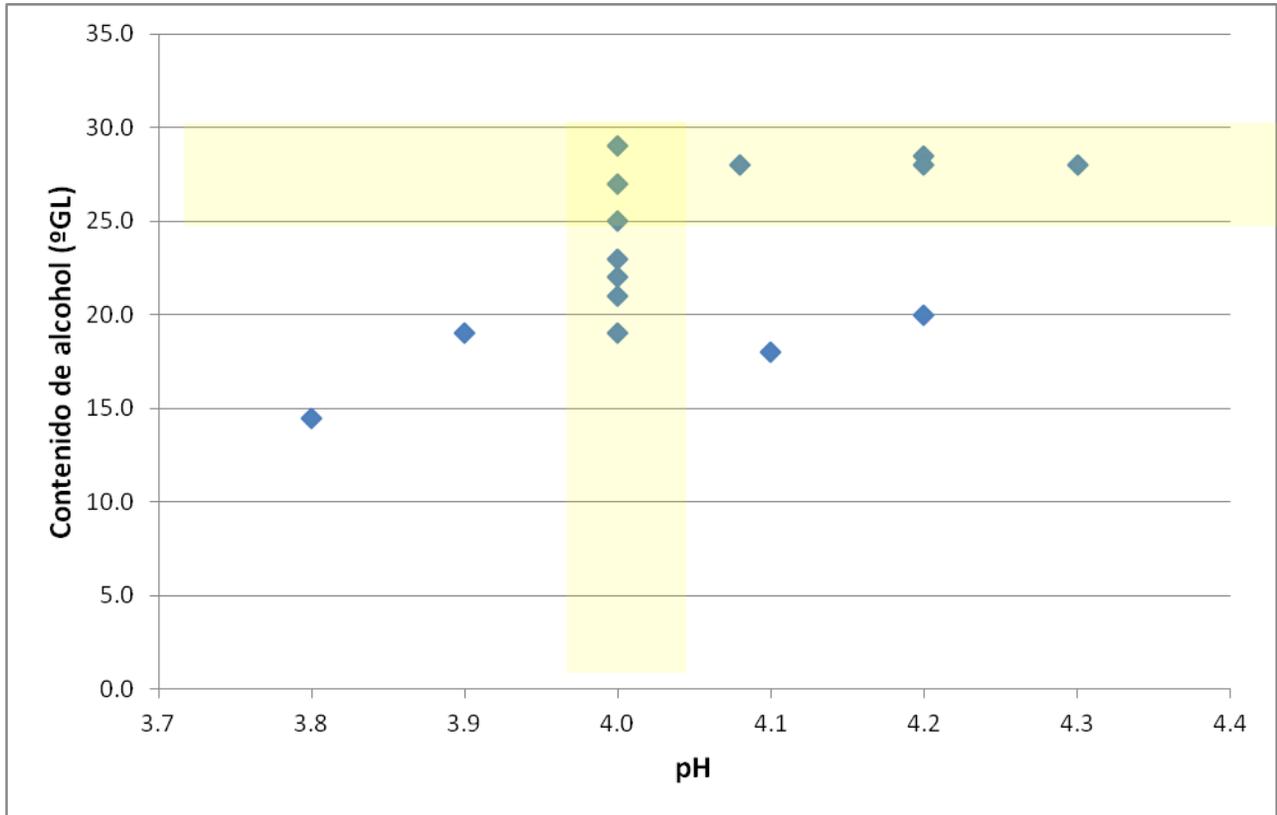


Figura 4B. Gráfica de respuesta de contenido de alcohol contra la variable pH.

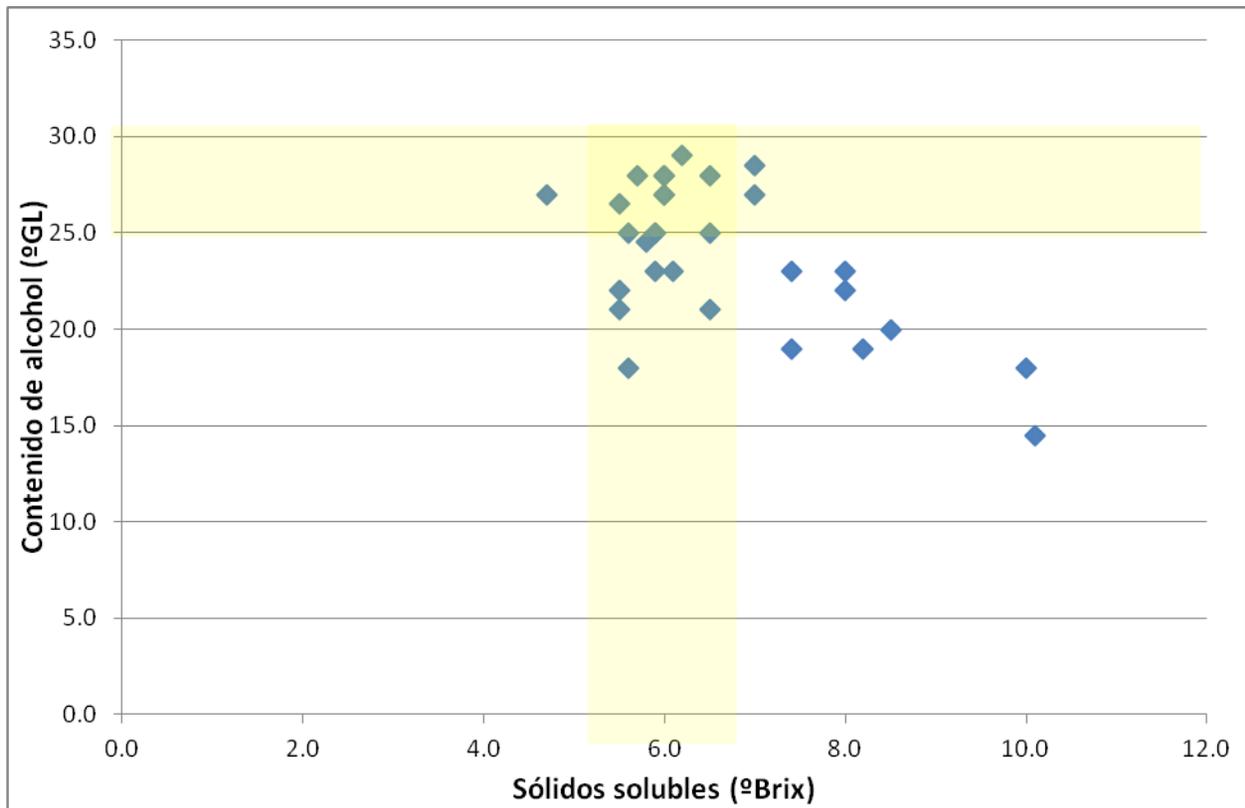


Figura 5B. Gráfica de respuesta de contenido de alcohol contra sólidos solubles.

Anexo C. NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.

Introducción

Esta Norma Oficial Mexicana (NOM) 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 NOM es necesaria de conformidad con el punto 4 de la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “mezcal” publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de noviembre de 1994 y con la fracción XV del artículo 40 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Las especificaciones que se señalan a continuación sólo podrán satisfacerse cuando en la elaboración del producto objeto de esta NOM, se utilicen materias primas e ingredientes de calidad sanitaria y se apliquen buenas técnicas higiénicas y de destilación que aseguren que el producto es apto para el consumo humano.

Objetivo

Esta NOM establece las características y especificaciones que deben cumplir los usuarios autorizados para producir y/o comercializar la bebida alcohólica destilada denominada mezcal.

2. Campo de aplicación

Esta NOM se aplica a la bebida alcohólica elaborada bajo el proceso que más adelante se detalla, con agaves de las siguientes especies:

- Agave Angustifolia Haw (maguey espadín);
- Agave Esperrima jacobi, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo);
- Agave Weberi cela, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
- Agave Patatorum zucc, Amarilidáceas (maguey de mezcal);
- Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina (Trel) Gentry (maguey verde o mezcalero); y
- Otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras

bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado. Cultivados en las Entidades Federativas, Municipios y Regiones que señala la Declaración General de Protección a la denominación de origen “mezcal”, en vigor.

Especificaciones

El producto objeto de esta NOM, en sus tipos I y II, debe cumplir con las siguientes especificaciones del producto. El producto objeto de esta NOM debe cumplir con las especificaciones físicas y químicas establecidas en la tabla 1.

Tabla 1		
ESPECIFICACIONES	MÍNIMO	MÁXIMO
% de alcohol en volumen a 20°C	36,0	55,0
Extracto seco g/l	0,2	10,0
Miligramos por 100 centímetros cúbicos referidos a alcohol anhidrido Acidez total (como ácido acético)	--	170
Alcoholes superiores mg/100 ml	100,0	400,0
Metanol mg/100 ml	100,0	300,0

De la materia prima

El agave que se utilice como materia prima para la elaboración de cualquier tipo de mezcal debe cumplir con los requisitos mencionados a continuación:

- a) Encontrarse madurado;
- b) Estar inscrito en el registro de plantación de predios instalado para tales efectos por el organismo de certificación de producto acreditado.

Del mezcal

El mezcal no debe haberse adulterado en ninguna de las etapas de su elaboración, particularmente a partir de la formulación de los mostos.

COMERCIALIZACIÓN

- Se permite la comercialización de mezcal a granel en sus tipos I y II sólo en el territorio de los Estados Unidos Mexicanos. Para mercado internacional no se permite la venta a granel y únicamente puede exportarse en envases hasta de 5 L.

- No se puede comercializar mezcal alguno que no cuente con un certificado vigente expedido por el organismo de certificación acreditado, de tal suerte, que cualquier autoridad competente puede requerir en todo momento la exhibición de dicho certificado o copia de él en el comercio. La vigencia del certificado no puede ser mayor de 6 meses. El producto embotellado que se exporte o se comercialice en mercado nacional debe ostentar visiblemente sin raspadura alguna el sello del organismo de certificación de producto acreditado o, en su caso, de la unidad de verificación acreditada.

- Se prohíbe la reventa a granel de mezcal al consumidor final en el mercado nacional.

- La compra y venta de producto a granel entre productores y acopiadores de mezcal será considerada como una operación de materia prima, y por consiguiente, permitida en esta NOM, siempre y cuando se realice bajo las condiciones siguientes:

10. Mercado y etiquetado

- Mercado y etiquetado en el envase

Cada envase debe ostentar una etiqueta o impresión permanente, en forma destacada, legible e indeleble con la siguiente información en idioma español.

- a) La palabra “Mezcal”;
- b) Tipo y categoría al que pertenece conforme al capítulo 5 de esta NOM;
- c) Marca comercial registrada en México;
- d) Contenido neto de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SCFI-1993.
- e) Por ciento de alcohol en volumen a 20°C, debiendo aparecer en el ángulo superior izquierdo, que podrá abreviarse “% Alc. Vol”;

- f) Sólo para el caso del tipo I, el por ciento de contenido de agave;
- g) Nombre o razón social, domicilio y Registro Federal de Contribuyentes del establecimiento fabricante del mezcal; o bien del titular del registro que ostente la marca comercial;
- h) En su caso, nombre o razón social, domicilio y Registro Federal de Contribuyentes del envasador;
- i) La leyenda “HECHO EN MÉXICO”;
- j) En su caso, las leyendas “ENVASADO DE ORIGEN” o, en su defecto, “ENVASADO EN MÉXICO”, conforme al capítulo 5.1.3; y
- k) Otra información sanitaria o comercial exigida por otras disposiciones legales aplicables a las bebidas alcohólicas