

Aspectos Químicos y Moleculares del Proceso de Producción del Mezcal

Pilar Escalante-Minakata^{1,2}, Ana P, Barba de la Rosa², Leticia Santos² y Antonio De León-Rodríguez²

¹Laboratorio de Bioingeniería Ambiental, FIC, Universidad de Colima. Km 9 Carretera Colima-Coquimatlán, CP. 28017. E-mail: minakata@uacol.mx

²División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Camino a la presa San José 2055, Col. Lomas 4^a secc. CP 78216, San Luis Potosí, S.L.P., México. E-mail: aleonr71@gmail.com

RESUMEN

En este trabajo se presentan los aspectos químicos y moleculares del proceso de producción del mezcal obtenido a partir de *Agave salmiana*. En este estudio se incluye la optimización de las condiciones fermentativas, la identificación molecular de la microbiota nativa y la cuantificación de los compuestos volátiles que impactan en las características finales de la bebida. Los resultados de la optimización de la etapa fermentativa mostraron que la concentración máxima de alcoholes superiores se alcanzó a los 28°C y una concentración de azúcar de 105 g/l. La productividad máxima se logró a 34.6°C y 90 g/l y el máximo rendimiento de etanol se obtuvo a 28°C y 77 g/l. Se identificaron 11 microorganismos diferentes en la fermentación; tres de ellos fueron las levaduras *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus*. Los otros ocho microorganismos fueron *Zymomona mobilis* subsp. *mobilis* y *pomaceae*, *Weissella cibaria*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus farraginis*. Referente al análisis cromatográfico de los mezcales jóvenes, reposados y añejos, se identificaron 37 compuestos volátiles. Se incluye una discusión de los trabajos realizados sobre mezcales obtenidos a partir de otras especies del género *Agave*, así como un análisis comparativo del perfil sensorial de 105 compuestos volátiles identificados en las bebidas que cuentan con distintas denominaciones de origen. Se concluye que 17 de ellos podrían ser referidos como marcadores de autenticidad.

Palabras clave: Mezcal, agave, fermentación, compuestos volátiles.

ABSTRACT

We present a study on the most relevant chemical and molecular aspects of the production process of the mezcal, obtained from *Agave salmiana*. The study includes the optimization of fermentative conditions, the molecular identification of native microbiota as well as the volatile compounds quantification that impacts on the final characteristics of the spirit. The fermentative stage optimization results showed that the maximum concentration of the higher alcohols was produced at 28°C and initial sugar concentration of 105 g/l. The maximum productivity process was attained at 34.6°C and 90 g/l and, the highest ethanol production was reached at 28°C and 77 g/l. Eleven different microorganisms

were identified in the mezcal fermentation. Three of them were the following yeast: *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* and *Kluyveromyces marxianus*. The other microorganisms found were *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* and *pomaceae*, *Weissella cibaria*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus farraginis*. Thirty-seven compounds were identified in commercial mezcals (white, rested and aged). Additionally, a comparative analysis of the sensory profile of mezcals obtained from different species of *Agave* genus is included. One hundred and five different volatile compounds were identified in Mezcal and others distilled beverages with distinct denomination of origin. We conclude that 17 compounds could be used as markers for authenticity.

Keywords: Mezcal, agave, fermentation, volatile compounds

INTRODUCCIÓN

El maguey llamado *metl* o *mexcalmetl* en lengua náhuatl, es una planta conocida y utilizada en México desde la época prehispánica. De sus jugos se preparaban bebidas fermentadas utilizadas para fines medicinales o rituales y sus hojas se empleaban para la producción de fibras, papel, clavos, cuerdas, costales y telas (Cervantes, 2002). Actualmente, la fabricación de bebidas alcohólicas destiladas es el uso más importante que se le ha dado a diversas plantas del género *Agave* (Herrera, 2008). Se cree que el proceso de destilación fue introducido a México con la llegada de los españoles; sin embargo, estudios realizados en la Pirámide de las Flores en la zona arqueológica Xochitécatl en el estado de Tlaxcala, muestran indicios de que se destilaba mezcal en Xochitécatl-Cacaxtla antes del arribo de los españoles (Serra & Lazcano, 2011), aunque este proceso al parecer no fue generalizado entre las culturas prehispánicas.

En casi todos los estados de la República Mexicana se producen bebidas alcohólicas con métodos tradicionales a partir de la fermentación de las azúcares de los agaves. El nombre que se usa para referirse a ellas varía de una región a

otra, entre los que destacan: tequila, sotol, bacanora, raicilla, sisal y mezcal (De León *et al.*, 2008^a). En el caso particular del mezcal, la norma Mexicana de bebidas alcohólicas (NOM-070, 1994) establece que únicamente puede ser producido en los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guerrero y Oaxaca. El proceso de elaboración del mezcal involucra 5 etapas principales que incluyen la recolección de las piñas, cocción y molienda de las mismas para extraer las azúcares, la fermentación y finalmente la destilación (Figura 1).

ORIGEN DE LA MATERIA PRIMA Y OBTENCIÓN DE JUGO

En México crecen alrededor de 150 especies del género *Agave* y se encuentran distribuidas en más de 75% del territorio nacional predominando en las zonas áridas y cálidas del sur (García, 2007). En el estado de Oaxaca se encuentran 52 especies siendo el estado con mayor diversidad de agaves en México. El mezcal en dicho estado se obtiene de tres especies principales: 1) *Agave angustifolia* Haw conocido comúnmente como agave espadín con extensos cultivos, 2) plantas de *Agave potatorum* y 3) *Agave karwinskii* (Segura, 2010). En la

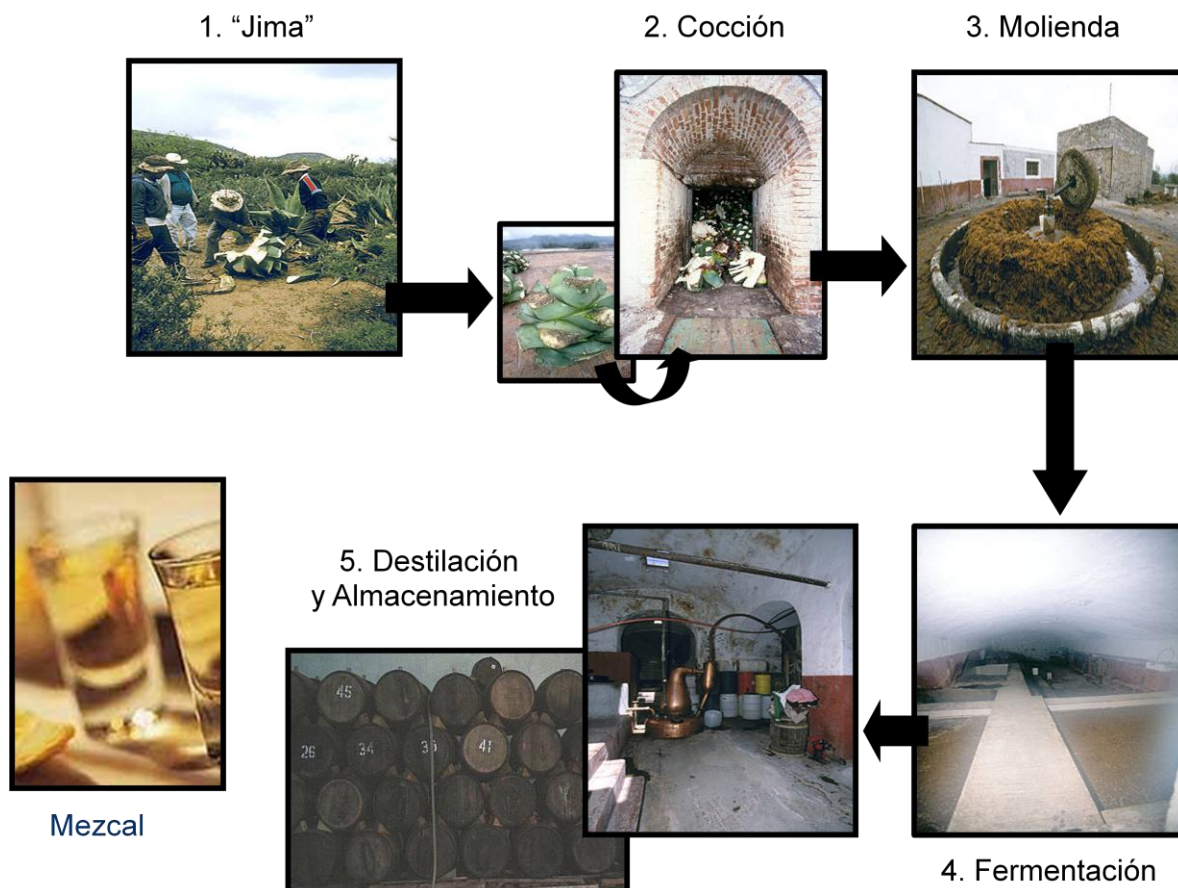


Fig. 1. Etapas del proceso de producción de mezcal.

región del altiplano Zacatecano-Potosino, la especie que predomina es el *Agave salmiana* Otto ex salm-dick distribuida en forma silvestre (Esparza-Frausto *et al.*, 2008).

El proceso para la elaboración del mezcal comienza cuando la planta ha alcanzado su estado de madurez alrededor de 10 años y es en autoclaves cuyo objetivo principal es la hidrólisis de los fructanos. Estos representan el 60% del total de los carbohidratos solubles

candidata a ser "jimada"; proceso que consiste en retirar las hojas o pencas de la planta para obtener el corazón o piña. Posteriormente es transportada a la fábrica para su procesamiento. Después de la recolección de las piñas se lleva a cabo el proceso de cocción el cual puede realizarse en hornos de piso, de mampostería o presentes en la planta. La inulina es un oligofrufructano con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ y constituye el carbohidrato de reserva de *A. tequilana*, *A.*

americana, *A. mapisaga*, *A. antroviensis* y *A. salmiana*. Entre las especies de *Agave* se presentan diferencias en la distribución de otros carbohidratos solubles como sacarosa, fructosa y glucosa. Esto se debe a las características ambientales que prevalecen en las regiones donde son cultivadas o cosechadas (Mancilla-Margalli & López, 2006). Durante el proceso térmico, las fibras se ablandan lo que facilita la molienda y la extracción del jugo que contiene azúcares simples, principalmente fructosa, que es un fácilmente metabolizada por las levaduras y bacterias alcohologénicas (Segura, 2010; López *et al.*, 2003). En ésta etapa también ocurren reacciones de caramelización o de Maillard que forman compuestos como 3-metil-1-butanol y alcohol feniletílico (Mancilla-Margalli & López, 2002). El sobrecalentamiento de los azúcares incrementa la concentración de furfural dando un sabor a ahumado y el exceso de caramelización reduce el rendimiento de etanol (Cedeño, 1995). En el estado de Oaxaca, la cocción se realiza en hornos de piso (Segura, 2010) y en la región de Zacatecas-San Luis Potosí se lleva a cabo en hornos de mampostería principalmente, aunque ya hay empresas que utilizan autoclaves de acero. Como siguiente etapa, las cabezas de las plantas cocidas se muelen con el objeto de extraer los azúcares fermentables. Esta molienda se realiza de dos maneras: Mediante una *tahona* (molino de piedra) como el que se muestra en la Figura 1 o con la acción de molinos mecánicos. El subproducto generado (bagazo) representa cerca de un 40% del peso total. Una vez que se ha extraído el jugo se

procede a preparar el mosto. Esto se hace ajustando el grado de sólidos disueltos en el medio para tener una concentración de azúcares que puede ir de 4 a 10% (p/v). El análisis de los carbohidratos no estructurales del *Agave salmiana* realizado por Michel-Cuello *et al.* (2008) reveló que el jarabe está compuesto de fructosa, glucosa, sacarosa, xilosa y maltosa.

FERMENTACIÓN DE LOS JUGOS DE AGAVE

Durante la etapa de la fermentación se emplea comúnmente el mosto ajustado a una concentración definida de sólidos disueltos, el inóculo formado por la microbiota nativa y sales inorgánicas como el sulfato de amonio. Esta práctica varía de una mezcalera a otra e incluso entre estados. De León-Rodríguez *et al.* (2008^a) realizaron la optimización de las condiciones de fermentación del mezcal de *A. salmiana* con el objetivo de maximizar la productividad, el rendimiento y la producción de etanol. Para ello, se utilizó la metodología de optimización por superficie de respuesta, y los factores seleccionados fueron la concentración de azúcares reductores y la temperatura. Los resultados mostraron que las condiciones de fermentación afectaron la concentración de alcoholes superiores (utilizados como marcadores de calidad) en el mezcal así como la concentración de etanol. La concentración máxima de 313±3 mg/l de alcoholes superiores se alcanzó a los 28°C y una concentración de azúcar de 105 g/l. La productividad máxima de 2.2 g/l-h se logró a 34.6°C y 90 g/l de azúcares y el máximo rendimiento de etanol de 0.44 se obtuvo a 28°C y 77 g/l de azúcares. Se concluyó

que la optimización simultánea de productividad y rendimiento de producto no son compatibles. Además de que la cinética de crecimiento presentó un comportamiento típico de inhibición por sustrato (De León-Rodríguez *et al.*, 2008a).

Otro aspecto importante que se debe tomar en cuenta durante el proceso fermentativo es el comportamiento de los consorcios de levaduras y bacterias. Las variables analizadas son denominadas estados como la concentración de microorganismos, concentración del producto, concentración de sustrato y en algunos casos concentración interna de enzimas (Escalante-Minakata & Ibarra-Junquera, 2007). Sin embargo, todos estos estados son difíciles de evaluar en tiempo real. Una solución a este problema es el desarrollo de modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias que contemplen entre sus estados, variables que sean fácilmente monitoreables en tiempo real. Dichos modelos permitirían el desarrollo de controladores que atiendan las perturbaciones inherentes a estos sistemas. Escalante-Minakata *et al.* (2009) describieron un algoritmo para el monitoreo continuo de la concentración de biomasa y etanol así como de la velocidad de crecimiento en el proceso de fermentación del mezcal de *A. salmiana* basado en la medición del potencial redox en línea. El procedimiento combinó una red neuronal artificial que relaciona el potencial redox con la concentración de etanol y de biomasa mediante un algoritmo basado en un observador no-lineal que utiliza las estimaciones de biomasa para inferir la velocidad de crecimiento de los microorganismos durante el proceso fermentativo. Los resultados mostraron que el potencial redox es un buen

indicador de la actividad metabólica de los microorganismos durante la etapa fermentativa.

ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA.

Las bebidas fermentadas que se producen de forma tradicional como el mezcal, se obtienen mediante fermentaciones espontáneas, es decir, no se añaden inóculos comerciales sino que actúan los microorganismos naturales presentes en el sustrato. Durante éste tipo de fermentaciones no se obtiene el producto de la acción de una única especie, ya que en ellas se llevan a cabo procesos bioquímicos muy complejos, en los que intervienen e interaccionan levaduras y bacterias (Torija, 2002). El principal argumento a favor indica que en estas fermentaciones se consiguen características organolépticas típicas de la zona que no estarían presentes si se utilizara un inóculo de cepas foráneas. La composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota presente a lo largo de la fermentación del mosto puede depender principalmente de los siguientes factores: La región de origen de la materia prima, el procedimiento de producción, la temperatura y el pH, (Torija *et al.*, 2001; Granchi *et al.*, 1999). Un resumen de los microorganismos identificados en los diferentes procesos fermentativos se muestra en la Tabla 1.

Lachance (1995), identificó por primera vez la microbiota nativa en un proceso fermentativo de *A. tequilana*, mediante técnicas morfofisiológicas. En este trabajo se destaca la presencia de *Candida intermedia*, *Candida krusei*, *Brettanomyces anomalus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora* spp., *Candida* spp.,

Tabla 1. Microorganismos detectados en los mostos para la producción de diferentes bebidas alcohólicas de plantas del género *Agave*.

Tipo de bebida	Microorganismos identificados	Método empleado	Referencia
Tequila	<i>Candida intermedia</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Brettanomyces anomalus</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>Issatchenkia/Pichia</i> spp., <i>Saccharomyces ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Candida milleri</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> .	Técnicas morfofisiológicas	Lachance, 1995
Mezcal de Durango	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Schwanniomyces castelli</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	RFLP-PCR de la región 18S.	Martell-Nevárez <i>et al.</i> , 2009
Mezcal de Tamaulipas	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Hortaea werneckii</i> , <i>Pichia mexicana</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia delftensis</i> , <i>Geotrichum klebahnii</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> .	Análisis de la región ITS-5.8S	Jacques-Hernández <i>et al.</i> , 2009
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Pichia mexicana</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Candida parapsilopsis</i> .	Análisis de la región 26S	Arratia <i>et al.</i> , 2009
Mezcal de Oaxaca	<i>Candida</i> sp., <i>Kloeckera</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Brettanomyces</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Candida boidinii</i> , <i>Candida coliculosa</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Citeromyces matriensis</i> , <i>Cryptococcus kuetzingii</i> ,	RFLP-PCR de la región ITS-5.8S	Andrade-Meneses y Ruiz-Terán, 2004
	<i>Hanseniaspora</i> sp., <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Zygoascus</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	RFLP-PCR de la región ITS-5.8S	Segura, 2009
Mezcal de San Luis Potosí y Zacatecas	<i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia fermentans</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> y pomaceae, <i>Weissella cibaria</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Lactobacillus pontis</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus farraginis</i> .	RFLP-PCR de la región del ITS-5.8S, 16S ADNr	Escalante-Minakata <i>et al.</i> , 2008
Pulque	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Microbacterium arborecens</i> , <i>Flavobacterium johnsoniae</i> , <i>Acetobacter pomorium</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Hafnia alvei</i> .	16S ADNr	Escalante <i>et al.</i> , 2004
	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Acetobacter orientalis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> .	16S ADNr	Herrera, 2008

Saccharomyces cerevisiae, *Pichia anómala*, *Issatchenkia/Pichia* spp., *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida milleri*, *Brettanomyces bruxellensis* y *Zygosaccharomyces rouxii*.

La identificación y clasificación de bacterias y levaduras por técnicas microbiológicas dependen del aislamiento, de sus características morfológicas y fisiológicas (Heras-Velazquez *et al.*, 2003; Díaz & Wachter, 2003; Orberá, 2004). Estos métodos tienen la desventaja de ser complejos, laboriosos y tiempo-demandantes (Deák, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Granchi *et al.*, 1999; Las Heras-Velazquez *et al.*, 2003). Además, algunas veces los resultados pueden ser dudosos, porque la morfología de los microorganismos dependen de las condiciones del cultivo. De ahí, que el uso de métodos microbiológicos para la identificación precisa de microorganismos en procesos fermentativos resulte inadecuada (Deák, 1998). Una alternativa para la identificación de bacterias y levaduras es aislarlos y tipificarlos mediante técnicas de biología molecular, otra es utilizar métodos que no dependen del cultivo, en los que se extraen los ácidos nucleicos directamente del alimento. El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) es una de las técnicas comúnmente utilizadas para la clasificación de microorganismos basadas en el ADN y por medio de la cual es posible distinguir microorganismos a nivel de especie (Penderson, 1986; Granchi *et al.*, 1999; Orberá, 2004). Con el uso de ésta técnica, Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) generaron una base de datos para la identificación rápida y fácil de 132 levaduras pertenecientes a 25 diferentes géneros. En la mayoría de los casos el tamaño del producto de

PCR y los patrones de restricción obtenidos con las endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* mostraron un patrón único para cada especie. La extracción directa de ADN y la amplificación de la región del gen 16S ARNr en procariotes y 18S ARNr en eucariotas provee una alternativa en estudios taxónomicos y filogenéticos (Borneman *et al.*, 1996; Dojka *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2001; Díaz & Wachter, 2003; Rivas, 2004). Escalante-Minakata *et al.* (2008) identificaron la comunidad de levaduras en la fermentación del mezcal de *A. salmiana* producido en San Luis Potosí mediante el uso de la técnica de RFLP-PCR de la región del ITS-5.8S. Las levaduras identificadas fueron *Clavispora lusitaniae*, *Pichia fermentans* y *Kluyveromyces marxianus*. En el caso del mezcal de Sola de Vega en el estado de Oaxaca obtenido a partir de *A. angustifolia* Haw, el grupo principal de levaduras identificadas pertenecen al género *Candida* sp., seguido por *Kloeckera* y *Rhodotorula*. Se encontró a *Saccharomyces cerevisiae* al inicio de la fermentación pero en pequeña cantidad (Andrade-Meneses & Ruiz-Terán, 2004). En contraste, estudios reportados por Segura (2009) en los fermentos de *A. angustifolia* Haw, mostraron 26 especies de levaduras pertenecientes a 18 géneros mediante la técnica de RFLP-PCR de la región ITS-5.8S. El estudio se realizó en 3 fábricas del estado de Oaxaca conocidas como Las Margaritas, Danzantes y Chagoya. Las levaduras encontradas fueron: *Brettanomyces* sp., *Candida* sp., *Candida boidinii*, *Candida coliculosa*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Citeromyces matriensis*, *Cryptococcus kuetzingii*, *Hanseniopsis sp.*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*

pombe, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Zygoascus sp.* y *Zygosaccharomyces rouxii*. En los mostos de *A. durangensis* se reportó la presencia de *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae*, *Schwanniomyces Castellii*, *Saccharomyces unisporus* y *S. cerevisiae* en las fábricas Nombre de Dios y el Mezquital en el estado de Durango (Martell-Nevárez *et al.*, 2009). Jacques-Hernández *et al.* (2009) analizaron los mostos de mezcal de la región de la Sierra de San Carlos en Tamaulipas, en el que cual se emplea principalmente *A. americana* L., *A. lophantha torrey*, *A. funkiana* k., *A. montium-sancticaroli* e identificaron mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS-5.8S la presencia de *K. marxianus*, *Hortaea werneckii*, *P. mexicana*, *R. glutinis*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *P. delftensis*, *Geotrichum klebahnii*, *C. lusitaniae* y *P. membranifaciens*. Arratia *et al.* (2009), identificaron la presencia *K. marxianus*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *P. kluyveri*, *P. guilliermondii*, *P. mexicana*, *C. lusitaniae*, *Z. bailii* y *C. parapsilopsis* en los mostos de la región de San Carlos, San Nicolás y Burgos en Tamaulipas.

Referente a las bacterias, Escalante *et al.* (2004) estudiaron la caracterización de la diversidad bacteriana en pulque, una bebida alcohólica (no destilada) mediante librerías de clonas del 16S ADNr. Este análisis reveló que la diversidad bacteriana en pulque es dominada en un 80.97% por *Lactobacillus* como son: *L. acidophilus*, *kefir*, *acetotolerans*, *hilgardii*, y *plantarum*, además demostraron la presencia de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborecens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*,

Gluconobacter oxydans y *Hafnia alvei*. Mediante la secuenciación del gene 16S ADNr, Herrera (2008) diferenció 6 especies de bacterias diferentes a partir de aislados de aguamiel, pulque y semilla, entre las que se encuentran *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc citreum*, *Acetobacter orientalis* y *Leuconostoc lactis*. Escalante-Minakata *et al.* (2008) realizaron la identificación molecular de bacterias en el proceso de fermentación del mezcal de *A. salmiana* a partir de la región del gene 16S ADNr. Los resultados mostraron la presencia de 8 especies diferentes, siendo las bacterias ácido-lácticas las que se encontraron en mayor abundancia. Entre las bacterias identificadas destacan la *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* y *pomaceae*, *Weissella cibaria*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus farraginis*. Lappe-Oliveras *et al.* (2008), confirmaron los trabajos publicados por Escalante-Minakata *et al.* (2008) ya que en los procesos fermentativos de bebidas mexicanas de agave están presentes bacterias lácticas principalmente y levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* formando consorcios microbianos complejos y que esto impacta significativamente en las características sensoriales así como el valor nutricional.

DESTILADO Y SU AROMA

Para la destilación se utilizan alambiques de cobre tipo *charentais* que está construido completamente de cobre laminado para aumentar su resistencia y conseguir una superficie lisa con el propósito de evitar la

incrustación de sustancias gruesas y realizar más fácil la limpieza (Flanzy, 2003). El alambique se compone de una olla (es común que tenga capacidad de 1100 litros) en la que se colocan los mostos fermentados, por encima de la olla se encuentra la cabeza o turbante que recoge los gases y los conduce a los platos refinadores, pasando posteriormente al refrigerante donde se enfrían y licuan los gases al pasar por un serpentín sumergido en una pileta de agua (Zamora, 1997). El proceso finaliza cuando el alcoholómetro colocado a la salida del serpentín indica aproximadamente 3% (v/v). A lo largo del proceso de destilación se obtienen tres fracciones principales: Las cabezas, el corazón y las colas. Las primeras fracciones del destilado que constituyen las cabezas son ricas en alcohol pero también en compuestos volátiles indeseables (acetato de etilo, etanal, metanol, etc.), después continua la segunda fracción o corazón hasta aproximadamente un 60% (v/v), que será el futuro mezcal y finalmente se obtienen los compuestos de alto peso molecular. Posteriormente, el destilado es estandarizado con agua con base en la norma mexicana de bebidas alcohólicas y el producto terminado se almacena (Gonzalez-Hernández, 2005). Durante el proceso fermentativo se desarrollan la mayor cantidad de compuestos volátiles que son obtenidos mediante la destilación de los mostos. Durante la permanencia de los destilados en barricas de roble blanco o encino se llevan a cabo una serie de reacciones químicas que transforman al producto adquiriendo características organolépticas propias. Según su maduración el mezcal se clasifica en joven, reposado y añejo. El mezcal joven es aquel que

una vez producido es embasado sin un proceso de maduración. El mezcal reposado permanece en recipientes de madera de roble blanco o encino para su estabilización por al menos 6 meses y en el caso del mezcal añejo, es sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de roble blanco o encino cuya capacidad máxima es de 200 litros. Todos los mezcales pueden ser abocados. En mezclas de diferentes mezcales añejos, la edad para el mezcal resultante será el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

El aroma de un alimento o bebida se puede definir como la sensación global producida por los compuestos que interaccionan con las terminaciones nerviosas sensitivas del gusto, olfato y la visión (Goff & Klee, 2006). El aroma está compuesto por centenares de compuestos volátiles que pertenecen a distintas familias químicas y que se encuentran en concentración muy variable (Ruiz y Martínez, 1997). Cabe mencionar que el umbral de percepción de las sustancias que condicionan el aroma puede variar desde $\mu\text{g/l}$ a mg/l , pero no necesariamente por encontrarse en mayor concentración su incidencia será mayor (Riu, 2005). En este sentido, el impacto sensorial está relacionado con la presencia de compuestos volátiles. El aroma puede provenir de la planta llamado aroma primario que incluye dos subcategorías: El varietal (compuestos volátiles libres presentes en la planta que dependen de la variedad utilizada y sus características) y el prefermentativo (aromas que se liberan de su combinación con otras sustancias llamadas precursores, debido a la actividad enzimática provocada por la tecnología aplicada). El aroma secundario proviene de los microorganismos que

se desarrollan durante la primera fermentación; está ligado a la presencia de ciertos tipos de enzimas y es el aroma mayoritario. El aroma terciario o post-fermentativo es el que se forma durante el añejamiento. Este último se desarrolla mediante reacciones químicas y/o bioquímicas a partir de aromas de etapas anteriores (Riu, 2005). De ahí que los compuestos volátiles presentes en los mezcales provienen de la planta y se van acumulando a lo largo del proceso. Peña-Álvarez *et al.* (2004) analizaron los terpenos presentes en plantas de *A. salmiana*, *A. angustifolia* y *A. tequilana*. De un total de 32 terpenos identificados, 21 de ellos se encontraron exclusivamente en el *A. tequilana*. El linalool, geraniol, *p*-cimene, limoneno, β -trans-ocimo y trans-nerolidol fueron encontrados en las tres especies de agave analizados. Otras moléculas de interés son los ácidos grasos de cadena larga presentes en las plantas de agave ya que éstos juegan también un papel importante en el perfil aromático de la bebida. Los ácidos grasos en presencia de altas concentraciones de etanol, durante el añejamiento, reaccionan entre sí formando ésteres. En plantas de *A. salmiana*, *A. angustifolia* y *A. tequilana* se han identificado ácidos grasos de cadena larga (Peña-Álvarez *et al.*, 2004). Vallejo-Cordoba *et al.* (2004), proponen que la cuantificación de los ésteres puede ser una alternativa para la clasificación de los diferentes tequilas

En los tequilas se han reportado alrededor de 175 compuestos que pertenecen a las familias de los acetales, ácidos, alcoholes, diferentes compuestos volátiles mediante el uso de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza de los diferentes destilados;

aldehídos, ésteres, furanos, cetonas, fenoles, piracinas, compuestos con azufre y terpenos. Entre los más importantes y que podrían ser los responsables del olor se encuentra: El isovaldehído, alcohol isoamílico, β -damascenona, 2-feniletanol y vainillina (Benn & Peppard, 1996). López (1999) reportó que los compuestos mayoritarios presentes en el tequila son el etanol, alcohol isoamílico, feniletanol, y los ácidos acético, decanoico y dodecanoico. De León-Rodríguez *et al.* (2006) identificaron 37 compuestos volátiles en mezcales comerciales (joven, reposado y añejo) de *A. salmiana*, mediante el uso de técnicas cromatográficas. Nueve de los compuestos identificados fueron clasificados como compuestos mayoritarios; entre los que destacan los alcoholes saturados, el lactato de etilo, etil 2-hidroxiopropanoato y el ácido acético; aquellos que se encontraron en menor concentración se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, etil ésteres de cadena larga, ácidos orgánicos, furanos, terpenos, alquenos y alquinos. Algunos ya se encuentran reportados en tequilas y otras bebidas alcohólicas. Posteriormente, De León-Rodríguez *et al.* (2008^b), realizaron un análisis exhaustivo de compuestos que permitieran clasificar o identificar los orígenes de destilados de agave producidos en la República Mexicana. Entre las bebidas estudiadas se encuentran la Raicilla, Sisal, Sotol, Bacanora, Mezcales obtenidos a partir de diferentes especies de agave, Tequila y Pulque (bebida alcohólica de agave no destilada). En el trabajo se identificaron 105 posteriormente fueron separados y analizados por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas. Se determinó que 17

compuestos volátiles podrían ser referidos como marcadores de autenticidad. El análisis multivariante de los compuestos mayoritarios (concentraciones superiores a 10 mg/l) mostró que es posible distinguir las diferentes bebidas a partir de ellos, es decir, es posible obtener una clasificación de acuerdo a su concentración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Ciencias de los Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Illinois, al programa UIUC-TIES del UAQ, al Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV unidad Irapuato al Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. Al apoyo técnico de Leandro G. Ordóñez Acevedo del IPICYT. También agradecemos a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB) por haber otorgado la distinción del Premio Sánchez-Marroquín 2009 a la mejor tesis doctoral.

REFERENCIAS

- Andrade-Menenses O & Ruiz-Terán F (2004) Study of yeast populations in mescal fermentation. PF17. 11th International Congress on Yeast. Yeast in Science and Technology, The quest for sustainable development. Rio de Janeiro, Brazil.
- Arratia M, Oliva A, de la Torre F, Trujillo E, Nevárez J & Larralde P (2009) Diversidad genética y capacidad fermentativa de levaduras involucradas en la producción del mezcal tamaulipeco. Resumen de las Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposium Internacional de producción de alcoholes y levaduras. Acapulco, México.
- Been SM & Peppard TL (1996) Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 44: 547-556.
- Borneman J, Skroch P, OSullivan K, Palus J, Rumjanek N, Jansen J, Nienhus J & Triplett E (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* June: 1935-1943.
- Carro D & Piña B. Identificación de cepas de levadura de interés enológico ACE Revista de Enología-CIENCIA. Disponible en: http://www.acenología.com/ciencias52_1.htm
- Cedeño CM (1995) Tequila Production. *Critic. Rev. Biotech.* 15:1-11.
- Cervantes M. 2002. Los agaves. Disponible en: www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Técnicas/Agave%20angustifolia.pdf
- De León-Rodríguez A, González-Hernández L, Barba de la Rosa AP, Escalante- Minakata P & López, MG (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave Salmiana. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1337-1341.
- De León-Rodríguez A, Escalante-Minakata P, Barba de la Rosa AP & Blaschek HP (2008a) Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from Agave salmiana using response surface methodology. *Chem. Eng. Process.* 47:76-82.
- De León-Rodríguez A, Escalante-Minakata P, Jiménez-García MI, Ordoñez-Acevedo G, Flores-Flores JL & Barba de la Rosa AP

- (2008b) Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technol. Biotech.* 46: 448-455.
- Deák T, Beuchat LR, Guerzoni ME, Lillie A, Meter G, Rohm H, Schnürer PV, Tabajdi PV & Westphal S (1998) A collaborative study on media for the enumeration of yeast in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 91-95.
- Díaz RG & Wachter RC (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev. Latin. Microbiol.* 45: 30-40.
- Dojka MA, Hugenholtz P, Haack S & Pace N (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon and chlorinated solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3869-3877.
- Escalante A, Wachter C & Farrés A (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 21-31.
- Escalante A, Rodríguez M, Martínez A, López-Munguía F & Gosset G (2004) Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 235: 273-279.
- Escalante-Minakata P & Ibarra-Junquera (2007) Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. *Revista SMBB* 11: 28-36.
- Escalante-Minakata P, Blaschek HP, Barba de la Rosa AP, Santos-Martínez ML & De León-Rodríguez A (2008) Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation process. *Let. Appl. Microbiol.* 46: 626-630
- Escalante-Minakata P, Ibarra-Junquera V, González-García R, De León-Rodríguez A & Rosu HC (2009) On-line monitoring of Mezcal fermentation based on redox potential measurements. *Bioprocess Biosys. Eng.* 32: 47-52.
- Esparza-Frausto G, Macías-Rodríguez F, Martínez-Salvador M, Jiménez-Guevara MA & Méndez-Gallegos SJ (2008) Insectos comestibles asociados a las magueyeras en el Ejido tolosa, Pinos, Zacatecas, México. *Agrociencia.* 42: 243-252.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F & Querol A (1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Flanzy C. Biotecnología, Fundamentos Científicos y Tecnológicos, 2ª. Ed., Mundi-Prensa, Madrid, 2003.
- García AJ (2007) Los Agaves de México. *Ciencias.* 87; 14-23.
- Goff SA & Klee HJ (2006) Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science.* 311: 815-819.
- Gonzalez-Hernández L (2005) Análisis cromatográfico del mezcal. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. pp. 1-81.
- Granchi L, Ganucci D, Messini A & Vincenzini M (2002) Enological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.* 2: 403-407.
- Herrera M, (2008) Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas

- de aguamiel, pulque y semilla. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Marina. CICESE Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja. pp.1-70.
- Jacques-Hernández C, Soto-Cruz ON, Rugiata M, Sifuentes-Rincón AM, Taillandier P & Ramón-Portugal F (2009) Ecología de levaduras del mezcal San Carlos, Tamaulipas. Resumen en las memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposium Internacional de producción de alcoholes y levaduras. Acapulco, México.
- Lachance MA (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *A. Van. Leeuw.* 68: 151-160.
- Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R, Arrizon-Gaviño J, Herrera-Suárez T, García-Mendoza A & Gschaedler-Mathis A (2008) Yeast associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.* 8: 1037-1052.
- Las Heras-Vazquez F, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez J & Rodríguez-Vico F (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.* 3: 3-9.
- López MG (1999) Tequila aroma. In: Flavor Chemistry of Ethnic Foods, Shahidi y Ho, New York: Kluwe Academic/Plenum Publisher pp. 211-217.
- López MG, Mancilla-Margalli NA & Mendoza-Díaz (2003) Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7835-7840.
- Mancilla-Margalli NA & Lopez MG (2002) Generation of maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 50: 806-812.
- Mancilla-Margalli & Lopez MG (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7832-7839.
- Martell-Nevárez MA, Páez-Lerma JB, López-Miranda J, Soto-Cruz NO, Rodríguez-Herrera R & Rutiaga-Quiñones OM (2009) Identificación de levaduras nativas aisladas de la producción de mezcal por análisis de RFLP's del gen 18S. Resumen en las memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposium Internacional de producción de alcoholes y levaduras. Acapulco, México.
- Michel-Cuello C, Juárez-Flores B, Aguirre-Rivera J & Pinos-Rodríguez J (2008) Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of Mezcal Agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *J. Agric. Food Chem.* 56: 5753-5757.
- Norma oficial mexicana -NOM-070- SCFI-1994. Bebidas alcohólicas. Mezcal. Especificaciones. Diario Oficial de la Federación: México, 28 Noviembre, 1994.
- Orberá T (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 15-19.
- Penderson MB (1986) DNA sequence polymorphism in the genus *Saccharomyces* III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal regions in brewing

- and other yeast strains. *Carlsberg Res. Commun.* 51: 163-183.
- Peña Álvarez A, Díaz L, Medinaa, Labastida C, Capella S & Vera LE (2004) Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1027: 131-136.
- Riu AM (2005) Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta. Tesis de grado de Doctor en Ciencias, Universidad de Barcelona, España.
- Rivas R, Velázquez E, Zurdo-Piñeiro JL, Mateos PF & Martínez ME (2004) Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J. Microbiol. Meth.* 56: 413-426.
- Ruiz Hernández M & Martínez Garoña M (1997) Curso popular de cata de vinos. Edita: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, España.
- Segura LE, (2010) Identificación y caracterización por métodos moleculares de levaduras aisladas del proceso de elaboración del mezcal en el estado de Oaxaca. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología en la especialidad de Biotecnología Productiva. CIATEJ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco. pp. 1-176.
- Serra C & Lazcano JC. Vida cotidiana Xochitecatl-Cacaxtla. Días, años, milenios. 1ª Edición. IIA UNAM. 2011.
- Torija MJ (2002) Ecología de levaduras selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tesis de doctorado. Universitat Rovira I Virgili. Departament de Bioquímica I Biotecnología. Facultat d'Enologia.
- Vallejo-Cordoba B, González-Córdoba AF & Estrada-Montoya MC (2004) Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5567-5571.
- Zamora MR (1997) El Mezcal en el Altiplano Potosino-Zacatecano. *Bebidas Mexicanas*, 6: 41-44.