



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOQUIMICA

TESIS

**DINÁMICA POBLACIONAL DE LOS CONSORCIOS
MICROBIANOS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESO DE
FERMENTACIÓN DEL MEZCAL EN LA LOCALIDAD DE LAS
PALMAS CONCEPCIÓN BUENAVISTA, COIXTLAHUACA,
OAXACA.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUIMICO

PRESENTA:

ALAN DE JESÚS JIMÉNEZ PACHECO

ASESOR:

DRA. CLAUDIA LÓPEZ SÁNCHEZ

COMISIÓN REVISORA:

DR. FELIPE DE JESÚS PALMA CRUZ

ING. JORGE MIGUEL MARTÍNEZ CANSECO

ING. JAIME GALVÁN ESPINOZA

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Roberto Jiménez Montero y Martha Elena Pacheco García que me apoyan sin condición alguna, permaneciendo siempre a mi lado y en cada paso que decido tomar, que en los malos momentos me brindan su amor, cuidado y aconsejando de la mejor manera para seguir adelante y no dejarme vencer, nunca me cansaré de agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos Carlos Roberto y Aketzalli Jiménez Pacheco, que me apoyan, están conmigo pese a todo momento y han confiado en mí, a mis tíos María del Carmen Jiménez Montero, Norma Jiménez Montero y Doroteo Arango Alvarado que más que tíos son mis segundos padres, de igual manera su apoyo fue de suma importancia para mi carrera y vida, estaré eternamente agradecido.

A mis primos que son como mis hermanos y demás familia que han sido parte fundamental durante todo el trayecto de mi carrera.

A mis asesores la Dra. Claudia López y el Dr. Felipe de Jesús Palma, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por brindarme su confianza, compartirme sus conocimientos durante todo el trabajo, orientarme y corregirme en mis faltas, infinitas gracias.

A mi asesor el Mtro. Víctor Adrián Espinoza por apoyarme, guiarme en el proceso del proyecto, y brindarme de sus conocimientos. A mis compañeros de laboratorio con quien compartí grandes momentos, por aportarme de sus conocimientos y aclararme dudas.

Y, por último, pero más importante, a Dios que me permitió lograr llegar hasta este momento, dándome salud, sabiduría y valor.

RESUMEN

El presente trabajo trata sobre el estudio de la dinámica poblacional de los consorcios microbianos que participan durante la fermentación del mezcal artesanal, en un palenque de la población de Las Palmas, Concepción Buenavista, Coixtlahuaca perteneciente al estado de Oaxaca. Se colectaron muestras de mosto cada 24 horas durante seis días y se midieron parámetros fisicoquímicos *in situ*. Las muestras fueron llevadas al laboratorio, en donde se aislaron los microorganismos cultivables presentes en estas muestras, enseguida se purificaron colonias aisladas hasta obtener cepas puras. Los resultados mostraron que durante la fermentación del mezcal intervienen principalmente levaduras, bacterias Ácido-Lácticas y bacterias Ácido-Acéticas. De las cuales se obtuvieron siete cepas de Levaduras, siete cepas de bacterias Ácido-Lácticas y nueve cepas de bacterias Ácido-Acéticas. Ya iniciada la fermentación se encontró que la población de levaduras fue disminuyendo a partir de la muestra tres y terminada la fermentación, la cantidad de levaduras es solo de dos, en el caso de las bacterias Ácido-Lácticas hay una variación en las muestras y en las Bacterias Ácido-Acéticas en los últimos dos días de la fermentación, hay crecimiento significativo de la población, ya que, en ese momento hay una gran producción de etanol que es la fuente de alimento de las bacterias acéticas, lo que indica que en ese momento de esta etapa se tenía una mayor concentración de alcohol por lo tanto las levaduras fueron disminuyendo, debido a que la mayoría no son tolerantes al etanol.

ÍNDICE

CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMAS A RESOLVER	4
OBJETIVOS.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	6
CAPITULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 Agave.....	8
2.1.1Tipos de Agave	9
2.2 Agaves utilizados mayormente para la producción del mezcal	10
2.3 Mezcal.....	12
2.3.1 Mezcal en Oaxaca	13
2.3.2 Tipos y categorías de Mezcal	14
Denominación de origen	15
2.4 Proceso de elaboración del mezcal	16
Corte	16
Cocción.....	17
Molienda	17
Fermentación	18
Destilación	18
2.5 Fermentación	19
2.5.1 Fermentación del mezcal.....	19
2.5.2 Fermentación Alcohólica.....	20
2.5.3 Fermentación Láctica.....	21
2.5.4 Fermentación acética.....	22
2.6 Dinámica poblacional de la fermentación alcohólica.....	23
2.6.1 Levaduras	25
2.6.2 Bacterias Ácido-Lácticas (BAL).....	26

2.6.3 Bacterias Ácido-Acéticas (BAA).....	27
CAPITULO III	29
METODOLOGÍA	29
3.1 Selección del lugar de muestreo	29
3.2 Trabajo de campo	30
3.2.1 Obtención de muestras.....	30
3.2.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos	31
3.2.3 Aislamiento de levaduras y bacterias Lácticas (BAL), Acéticas (BAA)	32
3.3 Trabajo de laboratorio	33
3.3.1 Preparación de medios de cultivo	33
3.4 Parámetros poblacionales obtenidos	35
3.4.1 Frecuencia	35
3.4.2 UFC	35
3.5 Purificación de levaduras y bacterias.....	36
3.6 Identificación de levaduras y bacterias hasta género.....	37
CAPITULO IV.....	38
RESULTADOS.....	38
4.1 Toma de muestras	38
4.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos	38
4.3 Aislamiento de levaduras, Bacterias Ácido-Lácticas, Bacterias Ácido-Acéticas.....	39
4.3.1 Levaduras	39
4.3.2 Bacterias Ácido-Lácticas.....	40
4.3.3 Bacterias Ácido-Acéticas	41
4.4 Frecuencia	41
Levaduras	42
Bacterias ácido-lácticas	44
Bacterias ácido-acéticas	46
4.5 Unidades formadoras de colonias UFC	49
4.6 Purificación	50
Levaduras	50
Bacterias Ácido-Lácticas.....	51

Bacterias Ácido-Acéticas	52
4.7 Identificación de levaduras y bacterias hasta género.....	53
4.7.1 Morfología macroscópica.....	53
4.7.2 Morfología microscópica	56
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos de los microorganismos que las realizan (Alcázar, 2011)	23
Tabla 2.2. Microorganismos detectados en los mostos para producción de diferentes bebidas alcohólicas de plantas del género Agave.....	24
Tabla 2.3. Especies de los géneros Acetobacter, Gluconobacter, Gluconoacetobacter, y Komagataeibacter	28
Tabla 3.1. Medio de cultivo YPD.....	33
Tabla 3.2. Medio de cultivo Agar ADS	33
Tabla 3.3. Medio de cultivo MRS	34
Tabla 3.4. Medio de cultivo GYC	35
Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos	38
Tabla 4.2. Unidades formadoras de colonias UFC	49
Tabla 4.3. Morfología colonial de levaduras, Agar en superficie	53
Tabla 4.4. Morfología microscópica de levaduras.....	56
Tabla 4.5. Morfología colonial de Bacterias Ácido-Lácticas, Agar en superficie	54
Tabla 4.6. Morfología microscópica de Bacterias Ácido-Lácticas	57
Tabla 4.7. Morfología colonial de Bacterias Ácido-Acéticas, Agar en superficie.....	55
Tabla 4.8. Morfología microscópica de Bacterias Ácido-Acéticas.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales lugares donde se comercializa el mezcal en México.	6
Figura 3.1. Localización Las Palmas Concepción Buenavista Fuente: Google maps	29
Figura 3.2. Toma de muestra Tina de Fermentación Las Palmas Concepción Buenavista.....	30
Figura 3.3. Determinación de parámetros fisicoquímicos.....	31
Figura 3.4. Aislamiento de levaduras y bacterias.	32
Figura 3.5. Tinciones	37
Figura 4.1. Aislamiento de Levaduras A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.	39
Figura 4.2. Aislamiento de Bacterias Ácido- Lácticas A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.	40
Figura 4.3. Aislamiento de Bacterias Ácido- Acéticas. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.	41
Figura 4.4. Cepas purificadas de levaduras.	50
Figura 4.5. Cepas purificadas de bacterias ácido-lácticas.....	51
Figura 4.6. Cepas purificadas de bacterias ácido-acéticas.	52

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 4.1. LEVADURAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.....	42
Gráfica 4.2. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.	44
Gráfica 4.3. BACTERIAS ÁCIDO-ÁCETICAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.	46
Gráfica 4.4. Dinámica poblacional de los consorcios microbianos presentes en la fermentación del mezcal en Las Palmas.....	48

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

México tiene una gran riqueza biológica es el centro de origen y diversidad de los Agaves que dominan el paisaje de México. Los agaves nos dan una amplia variedad de productos tanto como alimento y bebida, definen la esencia biológica y cultural de nuestro país. Son plantas que dominan la mayor parte de los paisajes de México, en forma de extensas poblaciones silvestres o cultivadas (Eguiarte, Equihua , & Espinosa Asuar, 2017). Los agaves fueron fundamentales en la alimentación y bebida de los antiguos mexicanos, además de proveerles fibras para todo tipo de uso y un sin número de otras aplicaciones. De estos se producen bebidas alcohólicas de suma importancia.

Las bebidas alcohólicas históricamente han jugado un papel relevante dentro de los ritos por su capacidad de afectar la mente. Su consumo ritual es potencialmente detectable por estar asociado a objetos, estructuras y edificios. Estos ritos pueden constituirse en indicadores de cómo evoluciona la complejidad social (Colunga GarciaMarin & Zizumbo Villareal, 2013).

El mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos. Es un líquido de aroma y sabor derivado de la especie de maguey o agave empleado, así como del proceso de elaboración (NOM-070-SCFI-2016).

El mezcal es obtenido por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de agaves cocidas y que fueron sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no. El mezcal es un líquido de color y sabor de acuerdo con su tipo (García Soto, Navarrete Bolaños, Jiménez Islas, Botello Álvarez, & Rico Martínez, 2003).

La importancia de la industria del mezcal en Oaxaca radica en la generación de empleos, ya que éstos se localizan, especialmente, en zonas marginadas.

Oaxaca, por sus propias características agroclimáticas, favorece la producción de agave y mezcal.

Actualmente, la mayoría de las fábricas en donde se elabora el mezcal, también conocidos como palenques, utilizan el proceso tradicional, razón por la cual la calidad del producto es muy variable. Aunque en todas las regiones productoras los fundamentos en la fabricación del mezcal son similares, los métodos varían debido a factores tales como el clima y las condiciones geográficas, entre otros. La producción del mezcal involucra cinco etapas elementales, y este trabajo se enfoca específicamente en la fermentación de los mostos.

La fermentación es una etapa importante en el proceso de producción de mezcal. En esta etapa los azúcares son transformados a etanol y otro compuesto como alcoholes con tres o más átomos de carbono y esteroides, compuestos responsables del aroma (Godínez, 2012) (Jimenez, 2009).

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microbios. Las levaduras son microorganismos cosmopolitas conocidos como los agentes de la fermentación. Antes se creía que únicamente *Saccharomyces cerevisiae* participaba en la fermentación y producción de bebidas alcohólicas; sin embargo, actualmente se sabe que los diferentes géneros de levaduras no-*Saccharomyces* participan en el proceso en su inicio, lo que influye en las propiedades sensoriales de las bebidas alcohólicas (Garibay, 2019).

Entre la microbiota se encuentran las levaduras y bacterias entre ellas las bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas.

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales son capaces de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales, con distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. Las bacterias ácido-lácticas se encuentran en una gran variedad de ambientes, incluyendo, productos lácteos, vegetales y plantas, cereales, carnes y productos cárnicos, de igual manera están presentes en la

fermentación del mezcal. Las bacterias ácido-acéticas que son catalasas positivas, oxidasas negativas y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono, lo que los hacen presentes en la fermentación alcohólica del mezcal para este caso.

Existe una gran variedad de compuestos que le dan los descriptores característicos al mezcal y es un reto entender todos los procesos bioquímicos que se dan en este proceso. Sin embargo, este trabajo presenta una contribución a la dinámica poblacional de tres grupos microbianos que son parte del consorcio que da las características al mezcal de esta región.

PROBLEMAS A RESOLVER

- Falta de información sobre cuáles son los organismos involucrados en la fermentación del mezcal.
- El conocimiento de la dinámica poblacional de la microbiota presente en la fermentación artesanal del mezcal es importante, sin embargo, su conocimiento es aún incipiente, por lo cual en este trabajo se propone realizar la caracterización de la dinámica poblacional de la misma.
- El conocer qué bacterias y levaduras están presentes durante la fermentación ayudará a explicar de manera presuntiva los principales productos aromáticos y volátiles que podemos obtener en el mezcal.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar cómo se desarrolla la dinámica poblacional de los consorcios microbianos que participan durante el proceso de fermentación del mezcal

ESPECÍFICOS:

- Colectar muestras durante el proceso de fermentación de mezcal en las Palmas Concepción Buenavista Coixtlahuaca, Oaxaca.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos que intervienen en la fermentación del mezcal en todo el proceso.
- Aislar levaduras y bacterias lácticas y acéticas cultivables en medios selectivos a partir de muestras tomadas en días consecutivos durante la fermentación del mezcal.
- Purificar las bacterias y levaduras en medios diferenciales para cada grupo microbiano con la finalidad de caracterizar todas y cada una de las cepas cultivables
- Identificar de manera presuntiva hasta género, las bacterias y levaduras presentes por morfología colonial y microscópica.

JUSTIFICACIÓN

La producción de mezcal es de suma importancia en el estado de Oaxaca, es una actividad económica muy importante, permite un gran derrame económico en el estado debido a la gran demanda que genera las influencias comerciales. El compromiso que tienen las familias oaxaqueñas en la producción del mezcal sostiene su sustentabilidad, gran parte del estado se dedica a la producción y comercialización que les genera un ingreso, ayudándoles a solventar sus gastos.

Oaxaca es el origen del 96.1% del total nacional de mezcal exportado, con destino a 42 países, su principal consumidor es Estados Unidos, seguido de Chile, España y Australia, mientras que a nivel nacional las ventas se concentran en la Ciudad de México (CRM, 2015), tal como se presenta en la figura 1

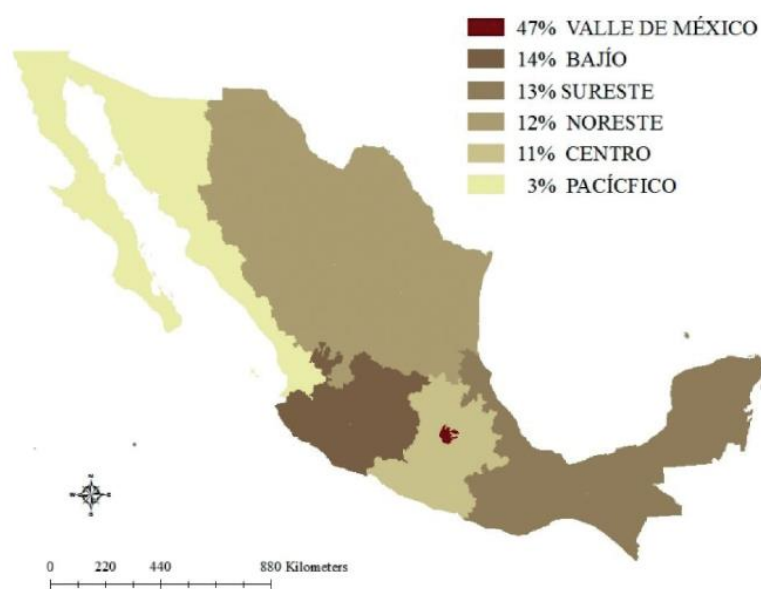


Figura 1.1. Principales lugares donde se comercializa el mezcal en México.

La fermentación tiene como objetivo la transformación de los azúcares del agave en una serie de compuestos que le dan las características a esta bebida alcohólica.

La fermentación es una de las etapas importante en la producción del mezcal, es la etapa más delicada en el proceso y el paso clave en la formación de sabores, en donde las levaduras actúan transformando el azúcar en alcohol etílico principalmente.

Derivado de la importancia de la industria del mezcal se han realizado diversos estudios enfocados a distintas temáticas entre las que destacan la de los compuestos volátiles en el mezcal, sin embargo, la información sobre los consorcios microbianos que participan en la fermentación del mezcal es incipiente por lo que es de importancia realizar más estudios para ampliar el área de conocimiento.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Agave

El agave, igual conocido como maguey, cuyo centro de origen es México y endémicos de América forma parte del paisaje de México en las zonas áridos y semiáridos. Dominan la mayor parte de paisajes de México y se encuentran en extensas poblaciones silvestres o cultivadas (Eguiarte, Equihua, & Espinosa Asuar, 2017).

Hernán Cortés llevo el nombre de Maguey a México nombrado así donde actualmente es República Dominicana. El nombre náhuatl que le daban los indígenas mexicanos a esta planta es *metl*, en purépecha *tacamba*, *huadá o bomi'ni* en otomí, *dua o doba* en zapoteco y *yabi* en mixteco (Scheinvar Gottdiener, 2017).

Los agaves son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto. Los magueyes son plantas xerofitas adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas (Garcia, 2007).

Pertenecen a la familia de las Agaváceas (*Agavácea*), donde sobresalen por sus tamaños y la gran variedad de formas que han adoptado a lo largo de un proceso de evolución. Son plantas perennes con rizoma y que generalmente carecen de tallos aéreos, sus hojas son capaces de almacenar agua y presentan diversos grados de succulencia, son fibrosas, terminadas en espinas y dispuestas en roseta, pueden ser largos o cortos presentando márgenes de pequeñas espinas ganchudas o rectas, su inflorescencia se presenta en forma de espiga o panoja con escapo y su fruto es una cápsula leñosa que deja salir numerosas semillas (Cervantes Ramírez, 2002).

El Agave tiene una gran importancia tanto cultural como económica en México, durante siglos se ha aprovechado como fuente de bebida, alimento, medicina, combustible, abono, implementos agrícolas entre otros. Actualmente presenta una de las principales fuentes de ingresos. Los pueblos de México lo domesticaron y diversificaron conforme

a las cantidades de azúcares y fibras que le proporcionaban, lo que posteriormente denominaron como base de las hojas que son las cabezas cocidas y los tallos (García Mendoza, 2007).

Restos encontrados en México indican que la relación del agave con los seres humanos es ancestral, se consumían desde hace más de 6000 años y fue parte de la transición de grupos nómadas a agricultores sedentarios, donde aprendieron a identificar que partes les eran útiles, en qué momento manipularlo y no interferir en su ciclo natural (Vela, 2018).

2.1.1Tipos de Agave

En México predomina la mayor población de la familia Agavacea. Se reportan datos que señalan que existen 200 especies de maguey de las cuales 150 se encuentran en México, lo que representa el 75% del total mundial. La mayor concentración se encuentra en Oaxaca con un 23%. La distribución del agave en el país es asimétrica hay regiones que poseen más especies que otras. Los más diversos se encuentran en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, su número disminuye drásticamente en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo debido a que son provincias húmedas y cálidas, por lo que su ausencia es notoria. Son abundantes en las provincias florísticas de las serranías meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental (Pérez Henández, Chavez Parga, & González Hernández, 2016).

Existen diversos tipos de agave en los cuales se clasifican en cinco tipos de magueyes según su uso: maguey pulquero, maguey mezcalero, maguey tequilero, Lechuguilla y Henequén (Cervantes Ramírez, 2002).

Los tipos de agaves que existen son:

<i>A. salmiana</i>	<i>A. marmorata</i>
<i>A. mapisaga</i>	<i>A. americana</i>
<i>A. inaequidens</i>	<i>A. hookeri</i>
<i>A. angustifolia</i>	<i>A. karwinskii</i>
<i>A. potatorum</i>	<i>A. cupreata</i>
<i>A. pacifica</i>	<i>A. tequilana</i>
<i>A. longisepala</i>	<i>A. lechuguilla</i>
<i>A. fourcroydes.</i>	

2.2 Agaves utilizados mayormente para la producción del mezcal

Entre los agaves más utilizados para la producción de mezcal en el estado de Oaxaca se encuentran (Nogales, 2018):

❖ ***Agave angustifolia* Haw**

Se le conoce como maguey espadín. Y de acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (CRM) es el más ocupado para la elaboración del mezcal, representa el 74% de los agaves utilizados. Es el más preferido debido a su corto periodo de maduración en relación con los otros agaves productores de mezcal.

❖ ***Agave potatorum* Zucc.**

Los nombres comunes como se le puede encontrar son tobalá y Papalometl, que viene del vocablo náhuatl, mariposa, este último nombre lo recibe por la forma de sus hojas que parecen alas de mariposas.

❖ ***Agave semmaniana* Jacobi.**

Es silvestre y a diferencia del *A. potatorum* sus hojas son más largas y se desarrolla muy bien en la sombra de los árboles también. Se distribuye principalmente en los distritos de Tlaxiaco, Miahuatlán, Pochutla, Yautepec y Tehuantepec.

❖ ***Agave rhodacantha* Trel.**

Su piña tiene más de 100 hojas (pencas) y su color tiene un verde más intenso, lo que le da la diferencia del *A. angustifolia*, también se le conoce en las comunidades como Maguey mexicano (Sola de vega), Espadillón (Teozacoalco, Nochixtlán), Cuixe (Santa Catarina Minas y Santa Ana del Río).

❖ ***Agave karwinskii* Zucc.**

Es endémica de Oaxaca y algunas zonas pequeñas al sur de Puebla. El tercer agave más demandado por los consumidores de mezcal, se le conoce en México como Cuishe y existen dos formas la forma Miahuatlán y la forma Amatengo la diferencia entre ellas es el grosor de los tallos y hojas. Es una especie micro endémica, ya que se da solamente en un área menor a 30 mil kilómetros cuadrados.

❖ ***Agave marmorata***

Se le conoce como maguey Tepeztate del náhuatl Tepetl que significa cerro, debido a que crece en los acantilados.

❖ ***Agave americana* var. *americana* Linneo**

Se le conoce como arroqueño, de horno entre otros nombres es de porte grande y sus hojas tiene un color verde blanquecino, debido a ceras que los cubre.

❖ ***Agave americana var. oaxacensis* Gentry**

Es similar al *Agave americana var. americana*. Pero es endémico de Oaxaca, En algunas comunidades como Sola de Vega la diferencia es través de las espinas. El *Oaxacensis* tiene espinas dorsales de color negra, de ahí su nombre común: Sierra negra, aunque en otras comunidades oaxaqueñas también le llaman maguey Arroqueño.

❖ ***Agave convallis* Trel**

Es endémico de Oaxaca y se le conoce como Maguey Jabalí o Maguey de cuche, contiene un alto contenido de saponinas que al contacto con la piel irrita fuertemente. A pesar de la incredulidad para producir mezcal con este maguey los maestros mezcaleros han logrado elaborar un mezcal de aromas y sabores complejos que se está convirtiendo en los favoritos de los consumidores.

2.3 Mezcal

La NOM-070-SCFI-2016, define al mezcal como una bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de maguey o agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos, cosechados en el territorio mexicano. El mezcal es un líquido de aroma y sabor que se deriva de la especie de maguey o agave diversificando sus cualidades por el tipo de suelo, topografía, clima, agua, productor autorizado, maestro mezcalero, graduación alcohólica, microorganismos, entre otros factores que definen el carácter y las sensaciones organolépticas producidas por cada Mezcal.

El jugo dulce de las cabezas del maguey cocido era dejado en reposo, fermentaba de manera natural, produciendo una bebida alcohólica que en náhuatl se llama tepache. El mezcal llamado en náhuatl como *metl*=maguey *calli*= cocido surgió como una bebida mestiza tras la llegada de los destiladores árabes. Se tiene evidencia que su origen es

indígena, y de que la destilación de fermentos de agave posiblemente se inició desde antes de la llegada de los españoles (Colunga GarciaMarin & Zizumbo Villareal, 2013). La historia del mezcal es fascinante se remonta hace nueve mil años aproximadamente donde los pueblos nómadas del desierto empezaron a consumir los tallos cocidos de los magueyes, que son ricos en azúcar y proteínas. En 1619 embarcaciones provenientes de Manila trajeron consigo la destilación de origen asiático, así el mexcalli, comenzó a ser sujeto de destilación en la Nueva España, formando parte de las “mercedes” que los indígenas ofrecían a militares y pobladores españoles. se prohibió su producción durante un siglo, debido a la fuerte competencia que se dio entre el “vino mezcal” y los licores de uva del viejo continente, obteniendo un permiso solo para José María Guadalupe Cuervo para producir “vino mezcal de Tequila” mientras que otros mezcales permanecieron clandestinos por siglos (Eguiarte Fruns & González González, 2007).

2.3.1 Mezcal en Oaxaca

Cuando se habla del mezcal se piensa inmediatamente en Oaxaca, pues es allí donde se encuentra la mayor diversidad de magueyes y se mantiene con más vida la tradición de elaborar mezcal (Eguiarte Fruns & González González, 2007). Oaxaca acuña la imagen y promoción del mezcal, es el principal referente de México, cuenta con la mejor participación en los siguientes indicadores: inventario de plantas de maguey (36.8 millones), número de productores de maguey (13,231), fábricas de mezcal (590) y volumen de mezcal envasado para exportación (49%) (Curiel Avilés, Ruiz Martínez, Delfín García, & Gómez Díaz, 2017).

Oaxaca es el estado con mayor producción de mezcal, con un 93.7 % y tiene la preponderancia con un 78.2 % del total de mezcal envasado en México, es uno de los estados donde se trabaja en mayor escala la elaboración de mezcal, y se utiliza generalmente el “maguey espadín” (*Agave angustifolia*) y en menor medida el “maguey tobasiche” (*Agave potatorum*) (Pérez Henández, Chavez Parga, & González Hernández, 2016). Pero hay otro mezcal oaxaqueño, que es una joya, y se hace a partir de la población silvestre de maguey tobalá (*A. potatorum* Zucc.).

También merecen una mención los mezcales que se elaboran puros o mezclados con *A. karwinskii* (tobasiche, cirial), *A. marmorata* (tepeztate), *A. rhodacantha* (mexicano) y *A. americana* var. *oaxacensis* (arroqueño) (Eguiarte Fruns & González González, 2007).

La presencia del mezcal oaxaqueño ha sido notoria en años recientes en el mercado internacional y se estima que las exportaciones aumenten con las acciones realizadas por el gobierno del estado y los productores debido a que es uno de los productos oaxaqueños que día a día gana mercado en el extranjero (Barragan Ramírez, 2002).

2.3.2 Tipos y categorías de Mezcal

De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-2016 establece los tipos y categorías de mezcal que son:

Tipo I. Mezcal 100% Agave. Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves; previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras (cultivadas o no). Este tipo de mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

Tipo II. Mezcal. Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes.

- Mezcal
- Mezcal artesanal
- Mezcal ancestral

De igual manera establece los tipos de mezcal existente

Madurado en Vidrio

Mezcal estabilizado en recipiente de vidrio más de 12 meses, bajo tierra o en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.

Abocado con

Mezcal al que se debe incorporar directamente ingredientes para adicionar sabores, tales como gusano de maguey, damiana, limón, miel, naranja, mango, entre otros, siempre que estén autorizados por el Acuerdo correspondiente de la Secretaría de Salud.

Destilado con

Mezcal que debe destilarse con ingredientes para incorporar sabores, tales como pechuga de pavo o pollo, conejo, mole, ciruelas, entre otros, en términos de la presente Norma Oficial Mexicana.

Mezcal añejo o añejado

Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año, en recipientes de madera de roble blanco o encino.

Mezcal joven

Producto obtenido por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras (cultivadas o no).

Mezcal reposado

Producto susceptible de ser abocado que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino, para su estabilización (Financiera Rural, 2011).

Denominación de origen

Se entiende por denominación de origen al nombre de una región geográfica del país que sirve para designar un producto originario de la misma y cuya calidad o característica se deban exclusivamente al medio geográfico comprendido en este los factores naturales y humanos (Aguirre & Larson, 2005).

Para los efectos de esta declaración de protección (denominación de origen del mezcal) se establece como región geográfica la comprendida por los estados de Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis potosí, Zacatecas, Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Puebla. Particularmente en el estado de Oaxaca, la zona denominada “la región del Mezcal” que incluyen los distritos de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán (Declaracion general de la proteccion a la denominacion de origen mezcal, 2015).

2.4 Proceso de elaboración del mezcal

En el estado de Oaxaca la producción del mezcal es el resultado de conocimientos transmitidos de generación en generación, es decir, la producción se realiza de forma artesanal. Los mezcaleros o palenqueros han conservado la esencia en el sistema aprendido siglos atrás. Actualmente, la mayoría de los palenques utilizan el proceso tradicional, razón por la cual la calidad del producto es muy variable. Aunque en todas las regiones productoras los fundamentos en la fabricación del mezcal son similares, los métodos varían debido a muchos factores como el clima y las condiciones geográficas, entre otros. La producción del mezcal involucra cinco etapas elementales: selección del tallo maduro o piña, corte de la piña, cocción, molienda, fermentación y destilación, aunque no se considera una etapa es de suma importancia el ajuste final del producto para su venta y distribución.

Corte

El proceso de elaboración del mezcal comienza con el capado o eliminación del escapo floral de las plantas adultas, con la finalidad de aumentar la producción de azúcares. Este proceso se realiza cada año antes de la cosecha de las piñas de agave, el cual comienza con la selección de las plantas que presenten coloración verde-amarilla en la base de las pencas y parda en la base del maguey, generalmente esto ocurre entre los 8 y 9 años del agave. El tamaño y peso de las piñas pueden ser muy diferentes en la misma zona de producción. El proceso de corte de las hojas o pencas tiene la finalidad de eliminar aquellos órganos de la planta que no son útiles para la

elaboración del mezcal. Una vez realizada esta operación se procede a transportar las piñas al palenque o destilería (Hernandez, 2014).

Cocción

La cocción de las piñas tiene como finalidad hidrolizar los fructanos en fructosa y glucosa (monosacáridos fermentables), generar compuestos organolépticos que le confieren aroma característico al mezcal, y el reblandecimiento de las piñas o tallos de maguey, lo que facilita la molienda y la extracción de los jugos. En este proceso, las piñas de agave son cocidas en hornos excavados en la tierra, los cuales tienen una capacidad de 3 a 7 toneladas de materia prima, y son recubiertos con piedra, estos se encuentran principalmente en los distritos de Tlacolula, Yautepec y Ejutla (Godínez, 2012) (Hernandez, 2014).

Seccionado del agave en estado cocido. El seccionado de las piñas se realiza en estado cocido. Para esta labor se utilizan machetes y hachas. Las dimensiones aproximadas a las que se reduce la piña son de 6 x 10 x 12 cm. El seccionado se realiza con el fin de obtener un material más cómodo para trabajarlo en la etapa de molienda.

Molienda

Tiene la finalidad de reducir el tamaño de la materia prima. Primero se reduce el tamaño del agave cocido y se deposita en un molino circular denominado “tahona o molino chileno o egipcio”. Este molino consiste en una rueda circular de piedra y/o cemento con un eje central y un peso aproximado de media tonelada, un eje vertical de madera de 20 a 25 cm de diámetro que sirve de eje a la rueda; caballos, mulas o burros que hacen girar la piedra sobre un piso de piedra o cemento en forma circular de aproximadamente 4 metros de diámetro y de 20 a 30 cm de profundidad (Hernandez, 2014) (Jimenez, 2009).

Fermentación

La fermentación, en un sistema semi-anaerobio, de los azúcares se realiza a través del metabolismo microbiano en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microbios; aunque originalmente se consideraba que las levaduras por ser microorganismos cosmopolitas eran los únicos agentes de la fermentación. Es por ello por lo que se considera que la fermentación es la etapa más importante en el proceso de producción de mezcal. En esta etapa los azúcares son transformados a etanol y otras moléculas orgánicas con tres o más átomos de carbono, responsables de los aromas y sabores de la bebida espirituosa (Godínez, 2012) (Jimenez, 2009).

Destilación

Una vez que ha sido finalizada la etapa de fermentación, se realiza la separación y concentración del etanol y los otros compuestos volátiles. Entre de ellos los alcoholes superiores, esteroides, ácidos, furanos, cetonas y terpenos los cuales contribuyen a las características sensoriales propias del mezcal. En Oaxaca la destilación de mezcal se realiza mediante equipos hechos de cobre (alambique) u ollas de barro (Jimenez, 2009).

La destilación en cobre se realiza principalmente en los distritos de Tlacolula, Yautepec, Miahuatlán, Ejutla y Ocotlán, en tanto que la destilación en ollas de barro y materiales de la región, aún se realiza principalmente en los distritos de Sola de Vega, Ocotlán y Tlacolula.

Condensación-refinamiento. Este proceso se caracteriza por ser netamente artesanal y la calidad del mezcal se determina a base de la experiencia del productor. La determinación del grado alcohólico se realiza de forma empírica utilizando una pipeta de carrizo.

Para la producción del Mezcal Artesanal se sigue el mismo proceso incluyendo algunos equipos específicos

Cocción: cocimiento de cabezas de maguey o agave en hornos de pozo o elevados de mampostería.

Molienda: con mazo, tahona, molino chileno o egipcio, trapiche o desgarradora.

Fermentación: oquedades en piedra, suelo o tronco, piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animal, cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).

Destilación: con fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro y montera de barro, madera, cobre o acero inoxidable; cuyo proceso puede incluir la fibra del maguey o agave (bagazo).

2.5 Fermentación

La fermentación es una de las técnicas más ancestrales usadas para conservar producir o transformar alimentos y bebidas. A través de reacciones metabólicas principalmente de los azúcares, se modifica la estructura de las materias primas como frutas, cereales, vegetales o carnes, entre otras, mediante la acción de diversos microorganismos, permiten la formación de ácidos orgánicos como: acético, láctico, butírico y propiónico, y de algunos alcoholes como el etanol y el láctico, así como la liberación de algunos aminoácidos. Estas reacciones traen como consecuencia modificaciones en el alimento, relacionadas con su sabor, olor, textura o color (Wacher Rodarte, 2014).

2.5.1 Fermentación del mezcal

La fermentación es una de las etapas más importantes y críticas, generalmente es espontánea con la microbiota nativa, la cual, transforma a los azúcares que contienen la materia prima en etanol, CO₂ y otros compuestos que forman caracterizan los sabores y aromas del mezcal.

El objetivo de la fermentación es lograr la máxima conversión de los azúcares de los agaves en alcohol, generar compuestos volátiles agradables que repercutirán en la calidad del mezcal producido y evitar la producción de sustancias no deseadas como la acidez (Kirchmayr, 2014).

Algunos equipos utilizados para la fermentación del mezcal son: Tinas de hoyos en el suelo, Tinas de madera, Tinas de cemento y/o piedra, Tinas de cuero de res, Tinas de plástico y Tinas de acero inoxidable (Kirchmayr, 2014).

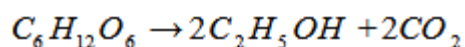
Las fermentaciones espontaneas son aquellas que se producen de forma natural, sin necesidad de un inóculo. En el caso del tequila y del mezcal, las fermentaciones son realizadas por las levaduras provenientes de la planta (Agave) y del ambiente dentro de la industria de producción. Esto hace que estas fermentaciones no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación; siendo importante estudiar la dinámica poblacional propia de las fermentaciones.

2.5.2 Fermentación Alcohólica

Las cepas de levaduras convencionales y no convencionales poseen la capacidad de producir etanol bajo distintas condiciones operativas y nutricionales durante la fermentación, mostrando distintos rendimientos en la producción de biomasa y etanol. La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos.

La fermentación alcohólica se realiza principalmente por levaduras que producen etanol y CO₂. Cuando hay oxígeno las levaduras realizan la respiración, crecen, oxidan completamente la glucosa y así obtienen el ATP, pero en condiciones de anaerobiosis, estos microorganismos fermentan azúcares, como la glucosa y algunas la lactosa. Así, la glucosa se transforma en ácido pirúvico, siguiendo la secuencia de reacciones de la glucólisis, y luego, el ácido pirúvico se transforma en acetaldehído mediante la enzima piruvato Descarboxilasa, seguidamente el acetaldehído se convierte en etanol por medio de la enzima alcohol Deshidrogenasa (Puerta Quintero, 2010).

Es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:

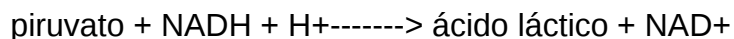


Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima. A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato (Vázquez & Dacosta, 2007).

2.5.3 Fermentación Láctica

La fermentación láctica es realizada por las bacterias *Lactobacillaceae* y *Enterobacteriaceae*, algunos protozoos y también en los músculos esqueléticos humanos, y consiste en la obtención de ácido láctico a partir de azúcares. En la fermentación láctica el piruvato producido en la glicólisis se transforma en ácido láctico mediante la enzima lactato-deshidrogenasa. El ácido láctico contribuye a la acidez y sabor de productos lácteos, vegetales, legumbres, cereales, carnes, y además, permite mejorar su estabilidad microbiológica e inocuidad, ya que restringe el crecimiento de otras bacterias que causan su descomposición (Puerta Quintero, 2010).

En condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobias), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y se reducen a NADH, para que puedan tener lugar las reacciones de la glucólisis productoras de energía es necesario reoxidar el NADH; esto se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico.



Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Ciertas bacterias (*Lactobacillus*, *Streptococcus*), al desarrollarse en la leche utilizan la lactosa (azúcar de leche) como fuente de energía. La lactosa, al fermentar, produce energía que es aprovechada por las bacterias y el ácido láctico es eliminado.

2.5.4 Fermentación acética

La fermentación acética es aquella que llevan a cabo las bacterias del grupo *Acetobacter*., estas bacterias son las encargadas de la producción mundial de vinagre, puesto que el ácido acético es la característica principal de este condimento, estrictamente hablando la fermentación acética no es una fermentación, sino que metabólicamente es una oxidación y las fermentaciones, tanto la alcohólica como la láctica, se caracterizan por llevarse a cabo en condiciones de anaerobiosis o al menos de baja presión parcial de oxígeno. La transformación del alcohol etílico en ácido acético se lleva a cabo por la bacteria mediante una cadena de 3 enzimas. Estequiométricamente hablando estas bacterias son capaces de producir un mol de ácido acético por cada mol de etanol presente en el medio, por lo que su eficiencia es enorme.

La primera enzima, llamado alcohol deshidrogenasa tiene como sustrato el alcohol etílico y lo transforma en acetaldehído. En el segundo paso del metabolismo el acetaldehído es hidratado. Para ello la bacteria emplea una molécula de agua H_2O . Convirtiendo el acetaldehído en acetaldehído hidrato. Finalmente, el tercer paso para la obtención de ácido acético es una segunda oxidación ésta se lleva a cabo mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa que libera otra molécula de hidrógeno que será captada por otro NAD y producirá una molécula de ácido acético (Contreras, 2014).

Por otra parte, el mecanismo de la fermentación acética no está aun completamente explicada y todos los datos que puedan acumularse sobre las variaciones de la fermentación bajo condiciones y atmósferas distintas contribuirán eventualmente a su mejor entendimiento.

Tabla 2.1. Ejemplos de fermentaciones comunes y algunos de los microorganismos que las realizan (Alcázar, 2011)

Tipo	Reacción Global	Microorganismo
Fermentación alcohólica	$Glucosa \rightarrow 2 Etanol + 2CO_2$	Levaduras, <i>Zymomonas</i>
Fermentación Homoláctica	$Hexosa \rightarrow 2Lactato^- + 2H^+$	<i>Streptococcus</i> Algunos <i>Lactobacillus</i>
Fermentación heteroláctica	$Hexosa \rightarrow Lactato^- + Etanol + CO_2 + H^+$	<i>Leuconostoc</i> Algunos <i>Lactobacillus</i>

2.6 Dinámica poblacional de la fermentación alcohólica

La fermentación del mosto es un proceso bioquímico complejo, en el que intervienen e interaccionan levaduras, bacterias y otros microorganismos. Entre todos ellos, las levaduras son los responsables de la fermentación alcohólica, en el mezcal, las fermentaciones son realizadas por las levaduras provenientes de la planta (Agave) de bacterias y del ambiente dentro de la industria de producción. Esto hace que estas fermentaciones no sean producto de la acción de una única especie o cepa de levadura, sino de una sucesión de especies y cepas de levaduras diferentes a lo largo de la fermentación; siendo importante estudiarla dinámica poblacional propia de las fermentaciones (Pérez, González-Hernández, Chávez-Parga, & Cortés-Penagos, 2013).

Tabla 2.2. Microorganismos detectados en los mostos para producción de diferentes bebidas alcohólicas de plantas del género Agave

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>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>Issatchenkia/Pichia spp.</i> , <i>Saccharomyces ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Candida milleri</i> , <i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> .	Técnicas morfo-fisiológicas	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 et al., 2009
Mezcal de Oaxaca	<i>Candida sp.</i> , <i>Kloeckera</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Brettanomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Candida boidinii</i> , <i>Candida coliculosa</i> , <i>Candida intermedia</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Citeromyces matriensis</i> , <i>Cryptococcus kuetzingii</i> , <i>Hanseniaspora sp.</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Zygosaccharomyces sp.</i> , <i>Zygoascus sp.</i> y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	RFLP-PCR de la región ITS-5.8S RFLP-PCR de la región ITS-5.8S	Andrade-Meneses y Ruiz-Terán, 2004 Segura, 2009
Mezcal de Tamaulipas	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Hortaea werneckii</i> , <i>Pichia mexicana</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia delftensis</i> , <i>Geotrichum klebahnii</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> . <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Torulaspora 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 ITS-5.8S y 26S	Jacques-Hernández et al., 2009, Arratia et al., 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 et al., 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> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Acetobacter orientalis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> .	16S ADNr	Escalante-Minakata et al., 2008 Herrera, 2008
---------------	---	----------	--

2.6.1 Levaduras

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. Se han utilizados, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX (Suárez-Machín, Garrido-Carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016).

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco μm . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales. Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera comercial), *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis* (Suárez-Machín, Garrido-Carralero, & Guevara-Rodríguez, 2016).

Las levaduras no-*Saccharomyces* forman parte de un consorcio fundamental en la fermentación de bebidas alcohólicas, ya que son estas las responsables de aportar la mayoría de las características organolépticas a los fermentos, los cuales en la mayoría de los casos enriquecen el aroma y/o sabor de las bebidas alcohólicas. *S. cerevisiae* es la levadura más empleada en procesos industriales donde se requiere tener control

de la fermentación, aunque también tiene importancia en diversas fermentaciones espontáneas. Esta levadura se caracteriza por tener alto poder fermentativo, aunque pose baja capacidad de producir compuestos secundarios, que son los que brindan características organolépticas a las bebidas y alimentos fermentados.

2.6.2 Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido-lácticas (BAL), se encuentran en una gran variedad de ambientes, incluyendo, productos lácteos, vegetales y plantas, cereales, carnes y productos cárnicos. las BAL se encuentran como contaminantes o adicionadas como cultivos iniciadores, para controlar los procesos de fermentación (Betancourt, Ayala, & Ramírez, 2014).

Las BAL han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria farmacéutica y de alimentos, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo coste energético de su producción. son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis- y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO₂ (Cabeza Herrera, 2006).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, tracto digestivo y vagina de mamíferos. Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. También otros alimentos son excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne. Por lo que son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de

productos lácteos, tales como la leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema y quesos como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas, y vegetales (Ramírez Ramírez, Rosas Ulloa, Velázquez González, Armando Ulloa, & Arce Romero, 2011)

Las BAL se clasifican en tres grupos de acuerdo con sus características fermentativas: las homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas, y las heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas estrictas degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no fermentan las pentosas o el gluconato. Los heterofermentativas estrictos degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético. Los facultativos heterofermentativas fermentan las hexosas a ácido láctico y puede producir CO₂ a partir del gluconato, pero no de la glucosa. Ellos también fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético. Las BAL de importancia en la industria de alimentos pertenecen a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* (Cabeza Herrera, 2006).

2.6.3 Bacterias Ácido-Acéticas (BAA)

Las BAA pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae*; están incluidas en el grupo de las α -Proteobacterias. Son microorganismos Gram-negativos, de forma elipsoidal o cilíndrica que pueden encontrarse aislados, en parejas o formando cadenas. Son móviles por flagelación polar o peritrica. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas. Poseen metabolismo aeróbico estricto, con el oxígeno como aceptor final de electrones. Presentan actividad catalasa positiva, oxidasa negativa y no forman endosporas. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 - 30 °C, aunque también pueden desarrollarse a temperaturas más altas (Mabel Gerard, 2015).

La clasificación de las bacterias acéticas ha variado enormemente en los últimos tiempos. En la actualidad, bajo este nombre se conoce un grupo de bacterias pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*,

Acidomonas, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia*, *Granulibacter* y *Saccharibacter*. El pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, si bien puede llegar a crecer a pH cercanos a 3. Dentro del mundo enológico, las especies más conocidas son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Hernández & Barbero, 2008).

No todas las especies ni todas cepas de una misma especie tienen la misma capacidad para oxidar el etanol a ácido acético, por lo tanto, es importante identificar a nivel de especie de BAA presentes en la fermentación y diferenciar entre cepas de BAA para determinar que cepas están involucradas en el proceso de fermentación y lideran la transformación. La siguiente tabla muestra las especies detalladas de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter*, y *Komagataeibacter* (Fernández Pérez, 2015).

Tabla 2.3. Especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter*, y *Komagataeibacter*

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Komagataeibacter</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Ga. aggeris</i>	<i>G. albidus</i>	<i>K. europaeus</i> (3)
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Ga. asukensis</i>	<i>G. cerevisiae</i>	<i>K. hanseni</i>
<i>A. cibernongensis</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>G. cerinus</i>	<i>K. intermedius</i>
<i>A. estunensis</i>	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>G. frateurii</i> (2)	<i>K. kakiaceti</i>
<i>A. fabarum</i>	<i>Ga. entanii</i>	<i>G. japonicus</i>	<i>K. maltaceti</i>
<i>A. farinalis</i>	<i>Ga. johannae</i>	<i>G. kanchanaburiensis</i>	<i>K. medellinensis</i>
<i>A. ghanensis</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>G. kondonii</i>	<i>K. nataicola</i>
<i>A. indonesiensis</i>	<i>Ga. maltiaceti</i>	<i>G. morbijfer</i>	<i>K. oboediens</i>
<i>A. lambici</i>	<i>Ga. persimmonis</i>	<i>G. nephelii</i>	<i>K. rhaeticus</i>
<i>A. lovaniensis</i>	<i>Ga. polyoxogenes</i>	<i>G. oxydans</i> (5)	<i>K. saccharivorans</i>
<i>A. malorum</i>	<i>Ga. sacchari</i>	<i>G. roseus</i>	<i>K. sucrofermentans</i>
<i>A. nitrogenifigens</i>	<i>Ga. takamatsuzukensis</i>	<i>G. sphaericus</i>	<i>K. swingsii</i>
<i>A. oeni</i>	<i>Ga. tumulicola</i>	<i>G. thailandicus</i> (3)	<i>K. xylinus</i> (3)
<i>A. okinawensis</i>	<i>Ga. tumulisoli</i>	<i>G. uchimurae</i>	
<i>A. orientalis</i>		<i>G. wancherniae</i>	
<i>A. orleanensis</i>			
<i>A. papayae</i>			
<i>A. pasteurianus</i> (6)			
<i>A. peroxydans</i>			
<i>A. persici</i>			
<i>A. pomorum</i>			
<i>A. senegalensis</i>			
<i>A. aceti</i>			
<i>A. syzygii</i>			
<i>A. tropicalis</i>			

CAPITULO III

METODOLOGÍA

3.1 Selección del lugar de muestreo

El proyecto fue realizado en Río de las palmas, es una localidad situada en el municipio de Concepción Buenavista perteneciente al estado de Oaxaca. Se encuentra ubicada a 11.3 kilómetros (en dirección Suroeste) de la localidad de Concepción Buenavista, a 1701 metros de altitud.

El clima es cálido, propicio para el cultivo de naranjas, aguacate, limón, toronja, plátano, guayaba, papaya, caña y mandarina (Finanzas Oaxaca, 2012).

La población total al año 2010 es de 42 habitantes de las cuales 24 son hombres y 18 son mujeres. Se tiene registrada 12 viviendas particulares habitadas con un grado alto de marginación municipal y un grado medio de rezago social de la localidad. La variación de la población desde el 2005 se encuentra que, en ese año, la población era de 29 hombres y 23 mujeres, un total de 52 habitantes. Es decir, al 2010 hay 10 personas menos, una variación de -19,23% (SEDESOL, 2015).

Hasta el año 2010, los indicadores de rezago social en la localidad de las palmas muestran que 20 habitantes de 15 años y más tienen educación básica incompleta y 3 sin derecho a servicios de salud. 7 viviendas con piso de tierra, 1 vivienda no dispone de excusado o sanitario, 11 no dispone de drenaje y 3 no dispone de energía eléctrica (CONEVAL, 2015).



Figura 3.1. Localización Las Palmas Concepción Buenavista Fuente: Google maps

3.2 Trabajo de campo

3.2.1 Obtención de muestras

La colecta de las muestras de mosto de maguey se realizó en el palenque de mezcal artesanal, ubicado en las Palmas, Concepción Buenavista. Basándose en la norma **NOM-230-SSA1-2002**, se realizó la toma de muestra de una tina en fermentación, que consiste en un tinaco de polietileno.

Sumergiendo una probeta de 1000 ml, se tomó una cantidad de mosto de mezcal y se vertió en un frasco de vidrio de 250 ml, la cual fue previamente cubierta en papel y esterilizado en autoclave a 15 libras por un tiempo de 15 min.

La colecta se realizó por un periodo de seis días tomando una muestra cada 24 horas. Las muestras se etiquetaron con un número de registro indicando la fecha, el número de muestra y su día consecutivo. Para su manejo, fueron colocadas en una hielera que se trasladó al lugar adaptado para su análisis.



Figura 3.2. Toma de muestra Tina de Fermentación Las Palmas Concepción Buenavista.

3.2.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Una vez que se tomaba la muestra, se determinaban los parámetros fisicoquímicos como son: pH, temperatura y grados Brix.

Para determinar el valor del pH se utilizó un medidor de pH digital portátil, para medir la temperatura se utilizó un termómetro de mercurio y para los grados Brix se utilizó un refractómetro.



Figura 3.3. Determinación de parámetros fisicoquímicos

En el laboratorio de control ambiental del Instituto Tecnológico de Oaxaca, se determinaron los azúcares reductores totales y los azúcares reductores directos, por el método de Lane-Eynon (método de Fehling) conforme a la AOAC 2002.

3.2.3 Aislamiento de levaduras y bacterias Lácticas (BAL), Acéticas (BAA)

Se hicieron diluciones hasta 1×10^{-5} de las muestras en caldo peptonado al 1%, y se sembraron en cajas Petri por triplicado 50 μ l por el método de extensión en placa, en 3 medios selectivos (Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD), Man Rogosa Sharpe (MRS) y Glucose-Yeast Extract-Calcium carbonate (GYC)).

Con una varilla de vidrio estéril se extendió los 50 μ l de la dilución sobre la superficie del agar de las cajas Petri y fueron incubadas por un periodo de 48 horas para bacterias y 72 horas para levaduras.

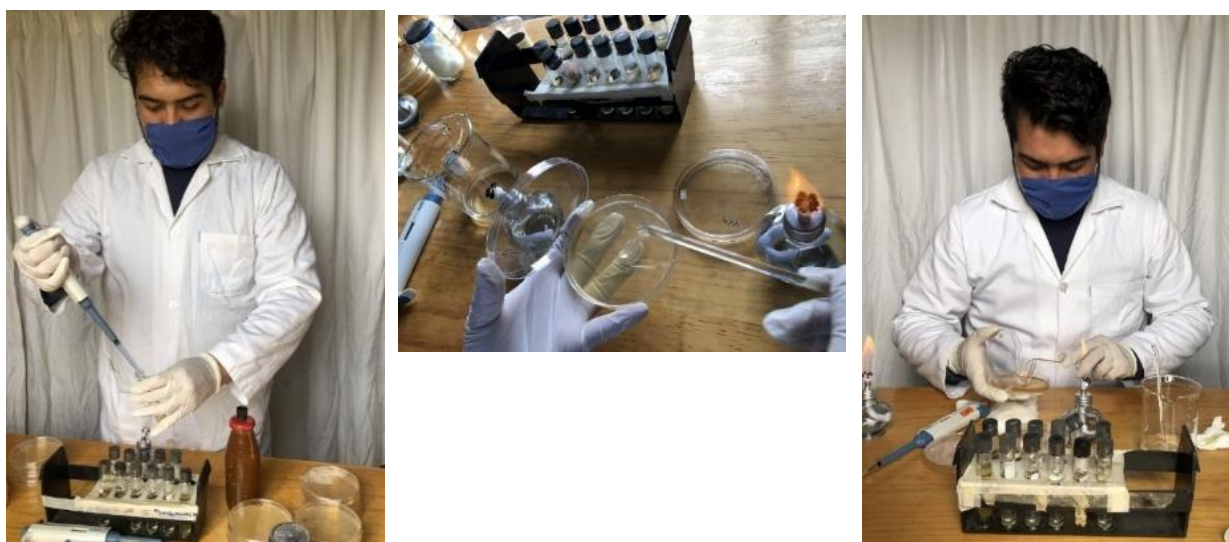


Figura 3.4. Aislamiento de levaduras y bacterias.

Para el aislamiento de Levaduras se utilizó el medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar. El medio se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión, 121°C, por un tiempo de 15 min. Ya estéril se vertió en placas Petri.

Para el aislamiento de las BAL y BAA, se utilizaron los medios Man Rogosa Sharpe (MRS) y Glucose-Yeast Extract-Calcium carbonate (GYC) respectivamente. Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión, 121°C, por un tiempo de 15 min. Ya estéril se vertieron en placas Petri.

3.3 Trabajo de laboratorio

3.3.1 Preparación de medios de cultivo

3.3.1.1 Medios de cultivo para levaduras

Medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar

El agar YPD se utiliza para mantener y desarrollar levaduras en procedimientos de microbiología molecular. Las levaduras crecen bien en un medio que contiene solo una cantidad mínima de glucosa y sales. El Agar YPD contiene dextrosa, sales y proteínas, lo que favorece el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y reduce los tiempos de crecimiento.

Tabla 3.1. Medio de cultivo YPD

Formula en g/L			
Reactivo	Cantidad (gr)	Reactivo	Cantidad (gr)
Agar bacteriológico	15	Peptona	20
Extracto de levadura	10	Dextrosa	20

Medio Sabouraud Dextrosa Agar (ADS)

El agar ADS es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos.

Tabla 3.2. Medio de cultivo Agar ADS

Formula en g/L			
Reactivo	Cantidad (gr)	Reactivo	Cantidad (gr)
Agar bacteriológico	15	Hidrolizado péptico de tejidos animales	5
Hidrolizado pancreático de caseína	5	Glucosa	40

3.3.1.2 Medio de cultivo para bacterias Ácido-Lácticas

El agar MRS es un medio selectivo, basado en la formulación desarrollada por de Man, Rogosa y Sharpe. Proporciona los nutrientes para un buen crecimiento de lactobacilos en general, pero en especial de aquellas cepas que presentan un crecimiento deficiente en otros medios existentes previamente como *L. brevis* y *L. fermenti*, reemplazando un producto variable. El medio es apto para el crecimiento de bacterias del ácido láctico, incluidos *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (CONDALAB).

Tabla 3.3. Medio de cultivo MRS

Formula en g/L			
Reactivo	Cantidad (gr)	Reactivo	Cantidad (gr)
Agar bacteriológico	10	Tween 80	1
Extracto de levadura	4	Citrato amónico	2
Peptona bacteriológica	10	Sulfato de manganeso	0.05
Sulfato magnésico	0.2	Acetato de sodio	5
Dextrosa	20	Fosfato dipotásico	2
Extracto de carne	8	pH	6,2 ± 0,2

3.3.1.3 Medio de cultivo para bacterias Ácido-Acéticas

El agar GYC descrito por Swings (1992) detecta la presencia de microorganismos productores de ácido y se considera un "medio de crecimiento estándar" para las bacterias del ácido acético.

La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El extracto de levadura es fuente de vitaminas, particularmente del grupo B. Cultivado en este medio, *Acetobacter* producirá zonas claras o halos alrededor de las colonias porque el ácido que se sintetiza neutralizará el CaCO_3 . A diferencia de las bacterias del ácido láctico, las bacterias del ácido acético son aerobias estrictas y, por lo tanto, es necesario utilizar placas sembradas en superficie. El agar bacteriológico es el agente solidificante (CONDALAB).

Tabla 3.4. Medio de cultivo GYC

Formula en g/L			
Reactivo	Cantidad (gr)	Reactivo	Cantidad (gr)
Agar bacteriológico	20	Carbonato de Calcio	5
Extracto de levadura	10	Dextrosa	50
pH	6,8±0,2		

3.4 Parámetros poblacionales obtenidos

3.4.1 Frecuencia

Se determinó la frecuencia en cada una de las placas de las levaduras y las bacterias Ácido-Lácticas y Ácido-Acéticas mediante un conteo de colonias. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas sembradas. Para los cálculos solo se reportaron las placas de entre 25 y 250 colonias

3.4.2 UFC

Para estimar los valores de las unidades formadoras de colonias se basó en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, en donde se reporta el método para obtener el valor de la UFC

Se consideraron “representativas” las cajas que tuvieron un número de colonias dentro del rango de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC. Y se aplicó la fórmula:

$$UFC = \text{numero de colonias} \times \text{dilucion signo contrario} \times \text{ml de muestra}$$

Se obtuvieron los promedios correspondientes de cada caja, y se aplicó el factor de dilución (1×10^5) que es el inverso y se redondeó el número a 2 cifras significativas y potencias de 10.

Las placas con el número de colonias menores de 25 se le agregó la leyenda "valor estimado". De igual manera, las placas mayores de 250, se contaron las colonias en

aquellas porciones de la placa representativas de la distribución de colonias y se agregó la leyenda "valor estimado".

3.5 Purificación de levaduras y bacterias

Se sembraron en medios diferenciales para cada grupo microbiano.

Se identificaron las diferentes colonias de cada placa y fueron resembradas nuevamente en placas Petri para obtener colonias aisladas, se resembraron dos veces más para asegurar la pureza de la colonia. Con el método de agotamiento por estría: tomando un asa bacteriológica implicando una sola inoculación de una sección de la placa Petri y disminuyendo la colonia arrastrando el cultivo de la sección inicial de otras secciones adicionales, aminorando la población. Las resiembras fueron incubadas a una temperatura, para levaduras de 28°C por un tiempo de 72 horas y para las bacterias Ácido-Lácticas y Ácido-Acéticas a una temperatura de 30°C por un tiempo de 48 horas.

Para la purificación de las levaduras se utilizó los medios de Sabouraud Dextrosa Agar (ADS) y Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar.

Para la purificación de las BAL se utilizó Man Rogosa Sharpe (MRS) y Agar Nutritivo.

Para la purificación de las BAA se utilizó Glucose-Yeast Extract-Calcium carbonate (GYC) y Glucose-Yeast Extract-Calcium-ethanol (GEY).

3.6 Identificación de levaduras y bacterias hasta género

Las levaduras, BAL y BAA se caracterizaron microscópicamente por medio de tinción simple y tinción de Gram, y por morfología colonial macroscópicamente con ayuda de un microscopio digital.

Para el caso de levaduras se realizó la tinción simple de azul de metileno: con un asa bacteriológica se tomó una colonia y se realizó el frotis sobre un portaobjeto con solución salina flameando con un mechero de alcohol, se agregaron unas gotas de azul de metileno y se dejó reposar por 1 min, se enjuagó con agua destilada y se flameo sobre el mechero para secarlo. Se observó por el microscopio usando un aumento de 100x.

Para las bacterias se realizó la tinción de Gram. Con un asa bacteriológica se tomó parte de una colonia y se realizó el frotis sobre un portaobjeto con solución salina flameando con un mechero de alcohol para fijar la muestra, se tiñó con cristal violeta durante un minuto, se retiró el exceso de colorante, se añadió yodo lugol, por un minuto, se retiró el exceso y se decoloró con alcohol acetona por 15 segundos, se lavó con agua destilada y por último se añadió el colorante de contraste, safranina, esperando un minuto, se lavó con agua destilada y se observó en el microscopio (40x, 100x).



Figura 3.5. Tinciones

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Toma de muestras

Se obtuvieron seis frascos con muestras correspondientes a los seis días que se dejó fermentar la tina de mosto para empezar a destilarlo y obtener el mezcal en el palenque de Las palmas Concepción Buenavista. Se etiquetaron las muestras con la leyenda de M1D1 para la muestra 1, M1D2 para la muestra 2, M1D3 para la muestra 3, M1D4 para la muestra 4, M1D5 para la muestra 5 y M1D6 para la muestra 6.

4.2 Determinación de parámetros fisicoquímicos

Al término de cada toma de muestra se determinaban los parámetros fisicoquímicos y los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos

Muestra	1 24 horas	2 48 horas	3 72 horas	4 96 horas	5 120 horas	6 144 horas
pH	4	4.2	4	3.9	3.4	3.3
Temperatura (°C)	26	24	22	22	21	20
Grados Brix	5	4	4	4	4	4
Azúcares reductores totales (%)	0.47	0.35	0.42	0.41	0.36	0.42
Azúcares reductores directos (%)	0.33	0.22	0.17	0.25	0.23	0.21

Se puede observar una disminución en el pH y la temperatura conforme pasa el tiempo, en los Grados Brix a partir de las 48 horas se mantiene constante.

Entre las 96 y 120 horas hay una gran variación del pH con respecto a los demás tiempos.

4.3 Aislamiento de levaduras, Bacterias Ácido-Lácticas, Bacterias Ácido-Acéticas

4.3.1 Levaduras

Las colonias de levaduras obtenidas por triplicados de las muestras se observan en la ilustración 6.

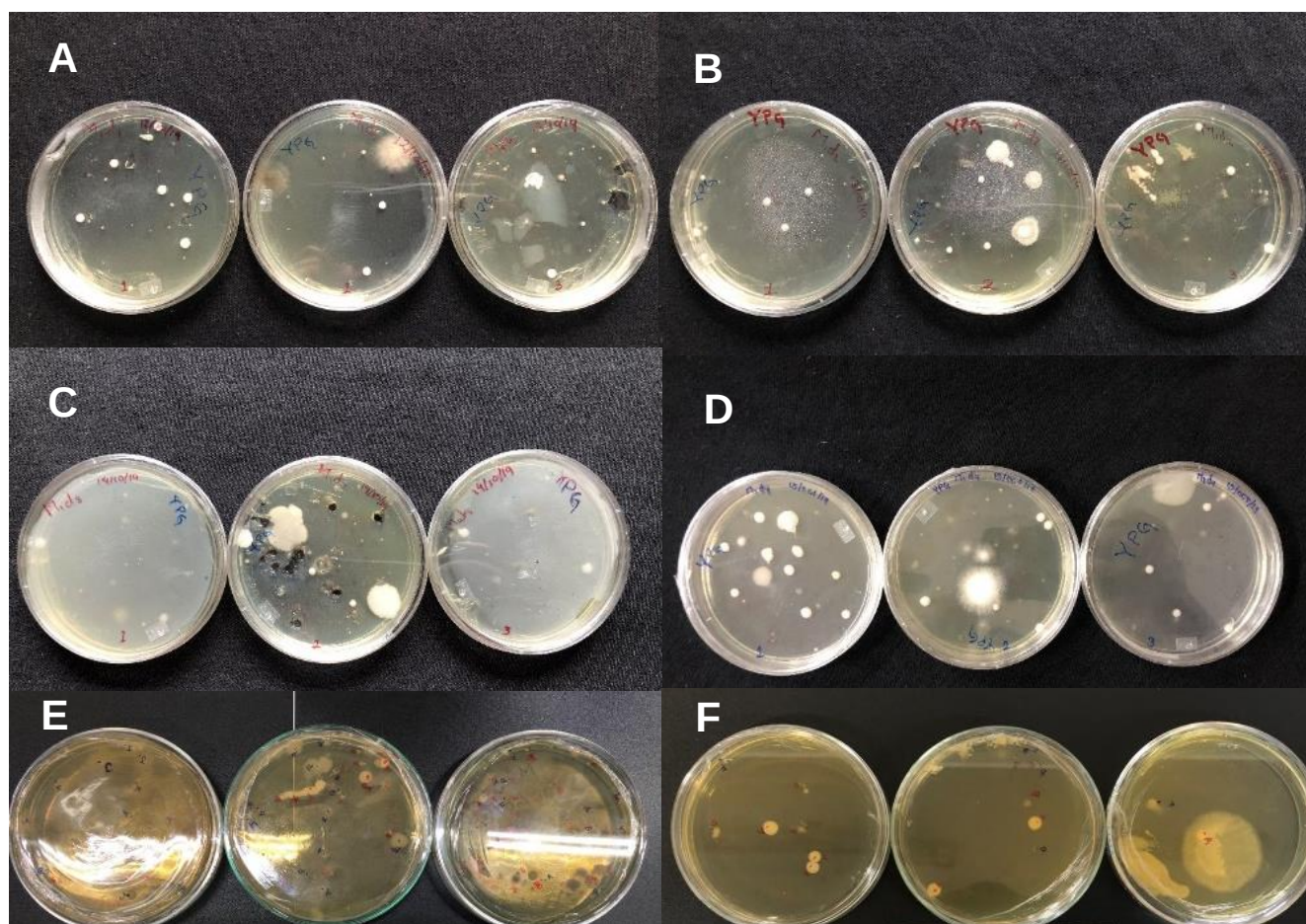


Figura 4.1. Aislamiento de Levaduras A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

4.3.2 Bacterias Ácido-Lácticas

Las colonias de BAL obtenidas por triplicados de las muestras se observan en la siguiente figura:

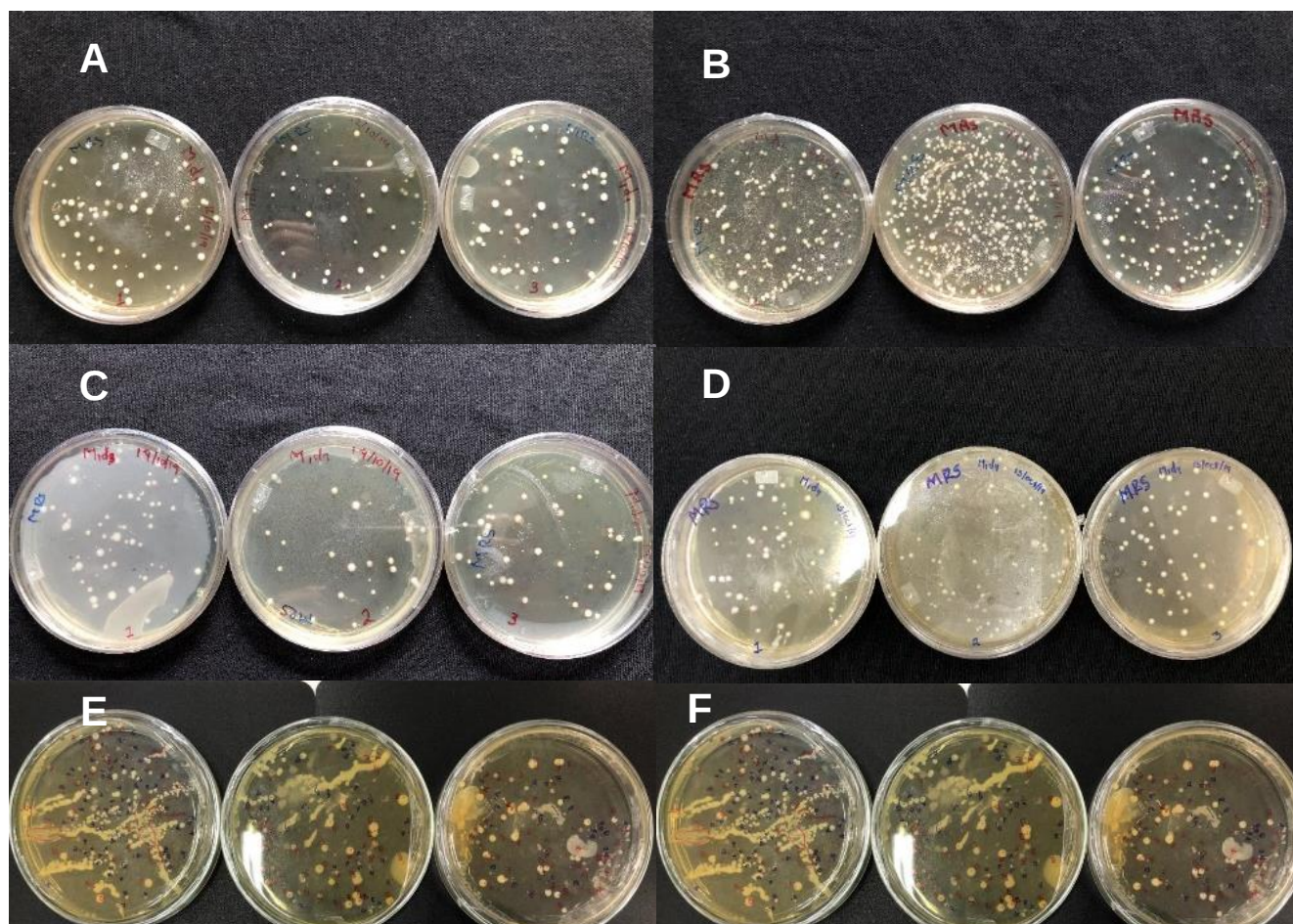


Figura 4.2. Aislamiento de Bacterias Ácido- Lácticas A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

4.3.3 Bacterias Ácido-Acéticas

Las colonias de BAA obtenidas por triplicados de las muestras se observan en la siguiente figura:

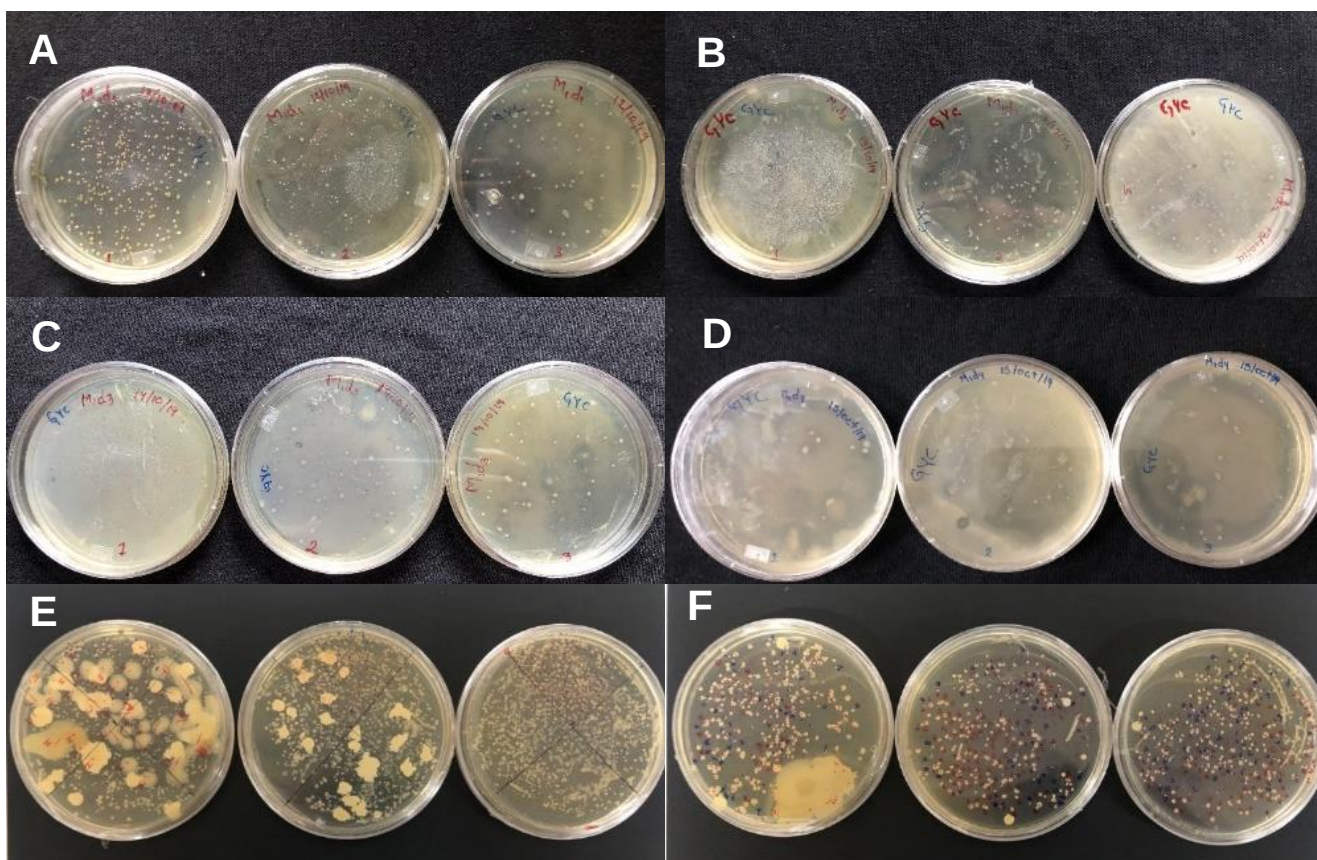
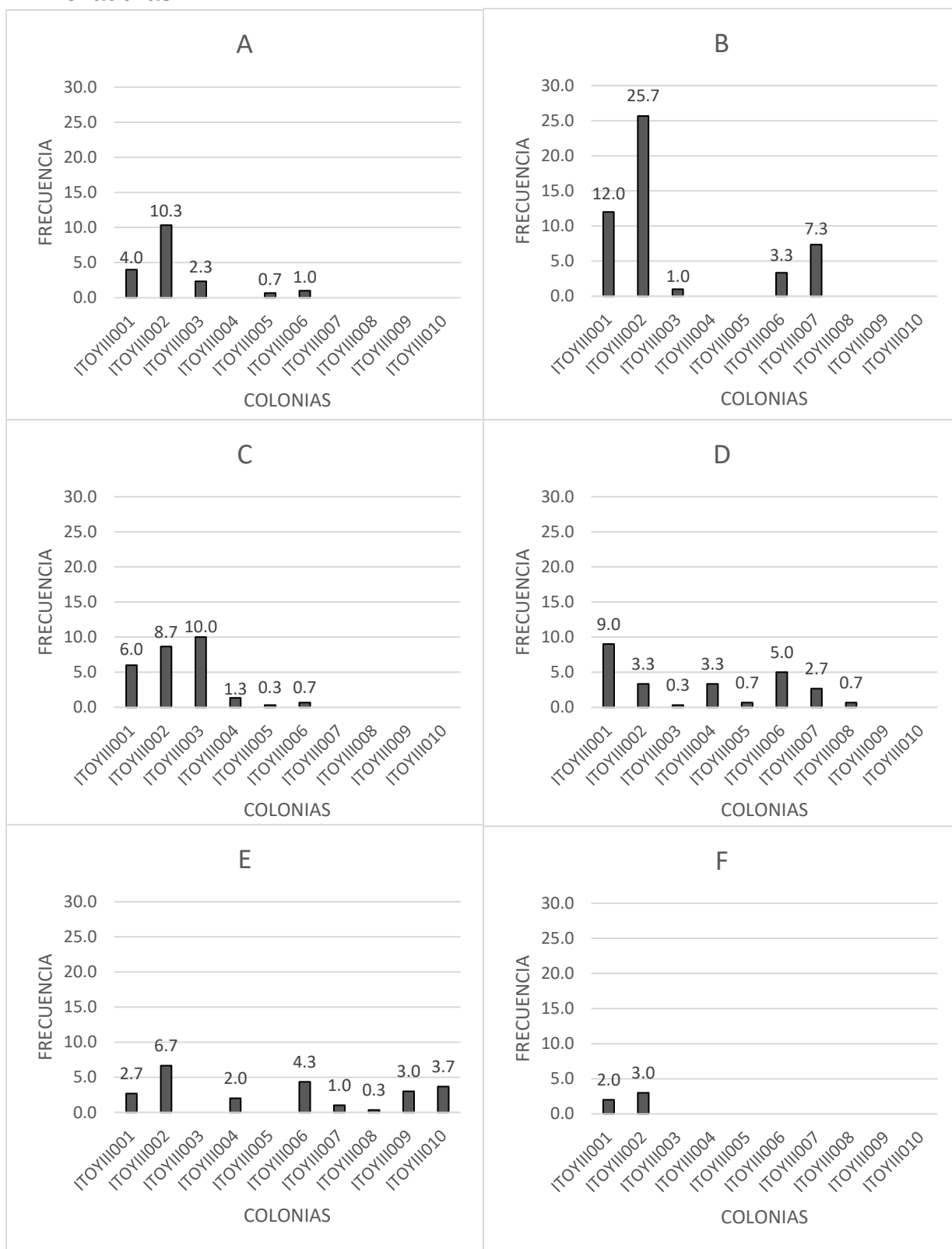


Figura 4.3. Aislamiento de Bacterias Ácido- Acéticas. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

4.4 Frecuencia

Se realizó el conteo para obtener la frecuencia de las colonias aparecidas en las placas Petri aisladas de las levaduras y las bacterias Ácido-Lácticas y Ácido-Acéticas. Se contaron todas las colonias aparecidas en las placas sembradas y se promedió los datos de las tres placas por muestra. En el caso de las bacterias Ácido-Acéticas se tomó una muestra representativa, debido a que la población de las colonias resultaba difícil de diferenciar

Levaduras



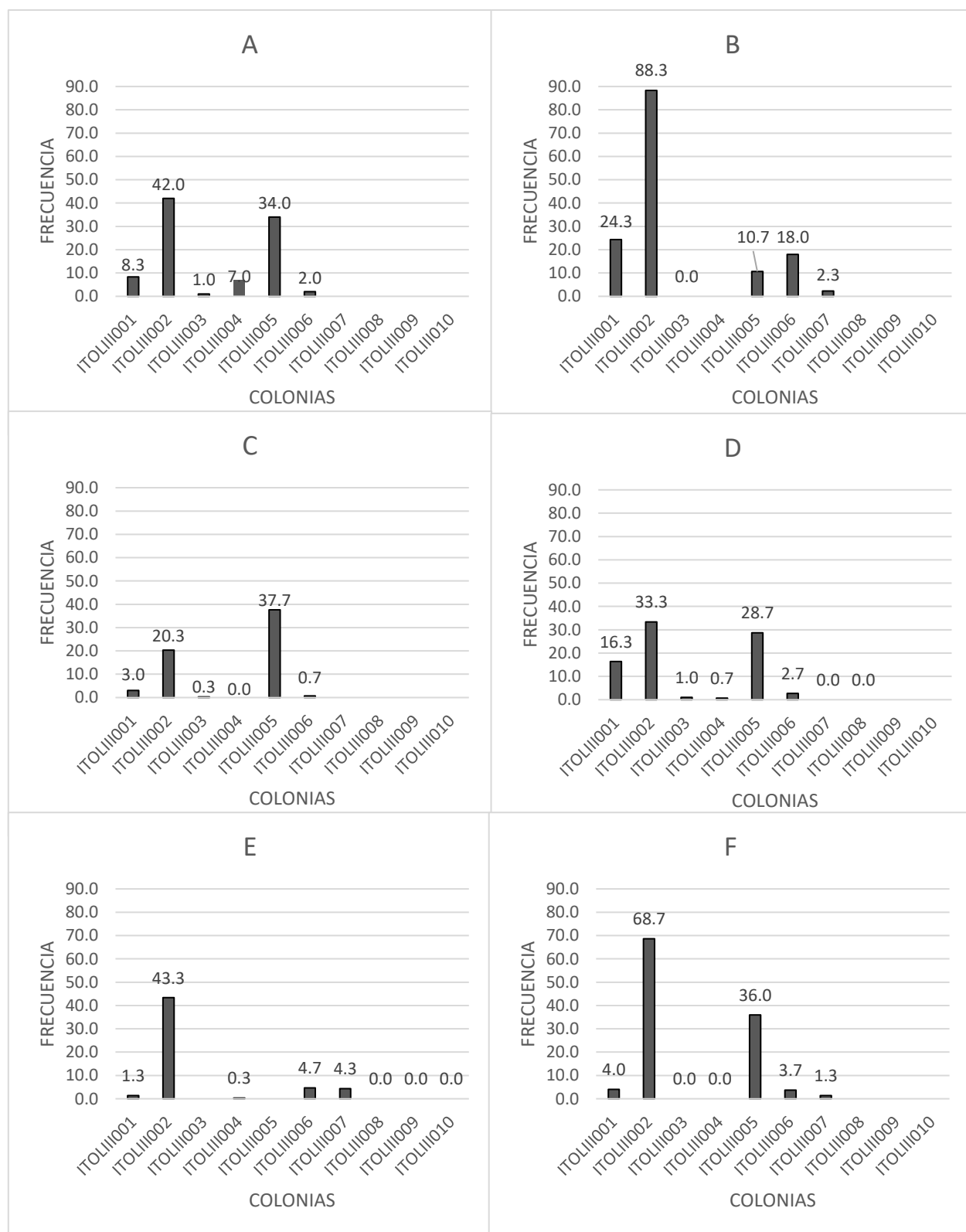
Gráfica 4.1. LEVADURAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

La gráfica 1 muestra la frecuencia de las levaduras obtenidas en las muestras tomadas durante el proceso de fermentación del mezcal en el palenque “Las Palmas”. Se observa que en el primer día de la fermentación aparecen cinco colonias de levaduras, siendo la más predominante la cepa 002 seguida de la cepa 001, 003, 006 y 005 con una frecuencia de 10.3, 4, 2.3, 1 y 0.7 respectivamente, en el segundo día se mantienen las cinco colonias, pero aparece una nueva cepa, la 007 con una frecuencia de 7.3, para el tercer día se agrega una colonia más, la cepa 004 con una frecuencia de 1.3, en el cuarto día la cepa 3 disminuye su crecimiento drásticamente con una frecuencia de apenas 0.3 mientras que aquí aparece una nueva cepa la 008 con una frecuencia de 0.7 y en el quinto día tenemos la máxima cantidad de colonias de levaduras presentes en la fermentación llegando a obtener ocho cepas diferentes de levaduras encontrando dos cepas nuevas 009 y 010 con una frecuencia de 3.7 y 3 respectivamente. Finalmente, en el último día de la fermentación disminuye drásticamente la cantidad de cepas, quedando solamente dos colonias de levaduras, la 002 y la 001 con una frecuencia de 3 y 2 respectivamente.

Esto indica que, en el quinto día de fermentación, el mosto está enriquecido de azúcares, teniendo la mayor concentración y por ende la cantidad de colonias de levaduras es mayor a los demás días y en el último día, que solo se tiene dos cepas se debe a que ya se tiene más concentración de etanol que azúcares lo que coincide con la finalización de la fermentación.

Se encontraron en total diez cepas de las cuales la mayoría se logran en el punto máximo de la fermentación, es decir a los 5 días, cuando la temperatura y los grados Brix están en su punto óptimo.

Bacterias ácido-lácticas



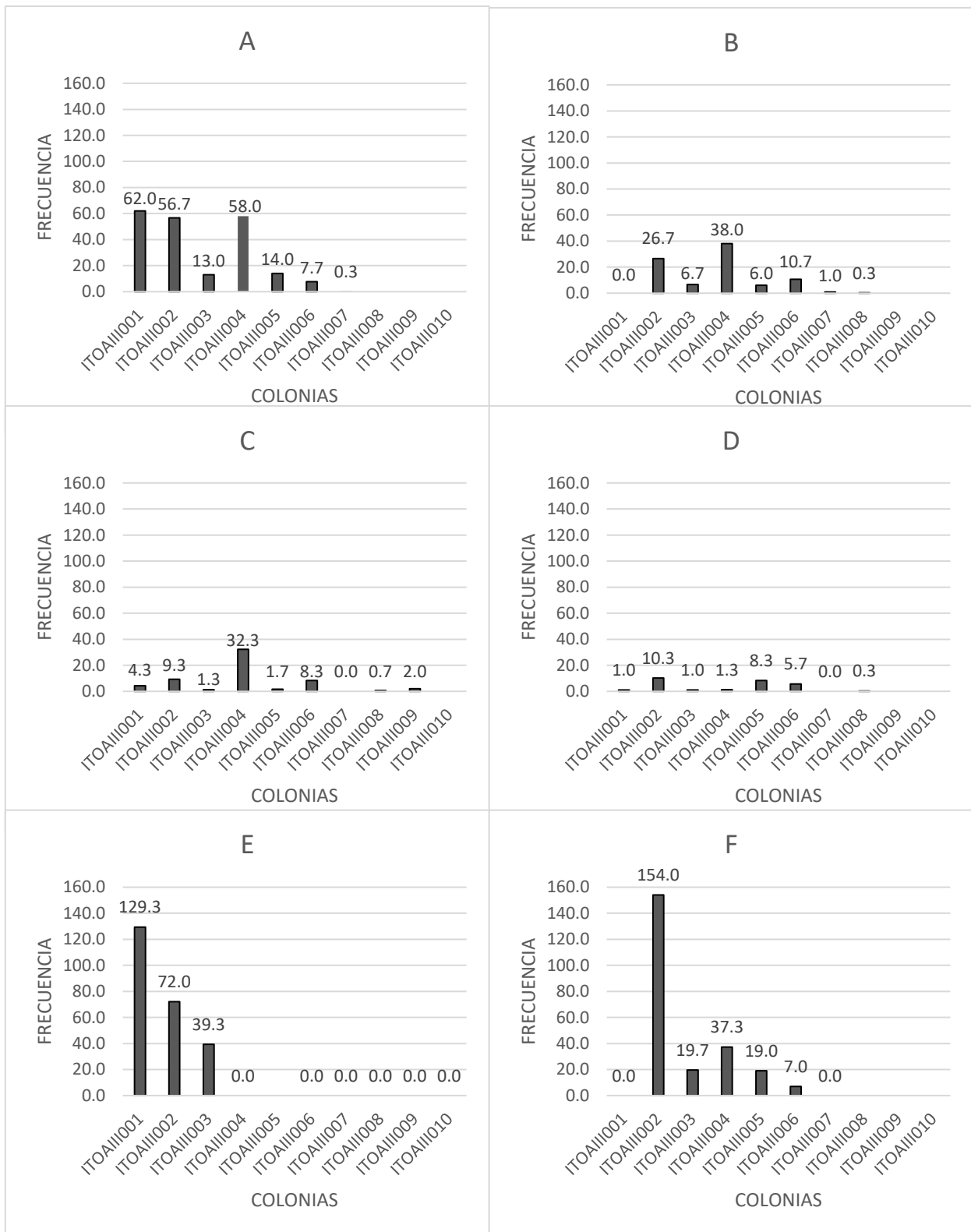
Gráfica 4.2. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

La gráfica 2 muestra las gráficas de la frecuencia de las BAL obtenidas en las muestras tomadas durante el proceso de fermentación del mezcal en el palenque “Las Palmas”. Se observa que no hay variación considerable en la aparición de las colonias, hay un total de seis cepas. En el primer día se observan seis cepas de las cuales la cepa 002 tiene la mayor densidad, seguida por las cepas 005, 001, 004, 006 y 003 con una frecuencia de 42, 34, 8.3, 7, 2 y 1 respectivamente. Para el segundo día solo se cuentan cinco cepas, desaparecen las cepas 003 y 004, pero se observan una nueva cepa, la 007 con una frecuencia de 2.3, en el día tres la cepa 003 reaparece con una frecuencia de 0.3, en el día cuatro se tienen las mismas cepas que en el día uno con una mínima diferencia en su frecuencia de aparición, para el día cinco se tienen cinco cepas muy parecidas al día dos con la pequeña diferencia de tener aquí a la cepa 005 y para el día seis se tienen exactamente las mismas cepas que en el día dos; 002, 005, 001, 006, 007 solo que con diferente frecuencia; 68.7, 36, 4, 3.7, y 1.3 respectivamente.

Las colonias de las cepas ITOLIII003, ITOLIII004 aparecen con menor frecuencia y desaparecen en el día dos, cinco y seis de la fermentación.

Las cepas ITOLIII002, ITOLIII005 aparecen con mayor frecuencia durante todos los días de la fermentación y la cepa 007 es la más escasa ya que solo aparece en los días dos, cinco y seis de la fermentación.

Bacterias ácido-acéticas

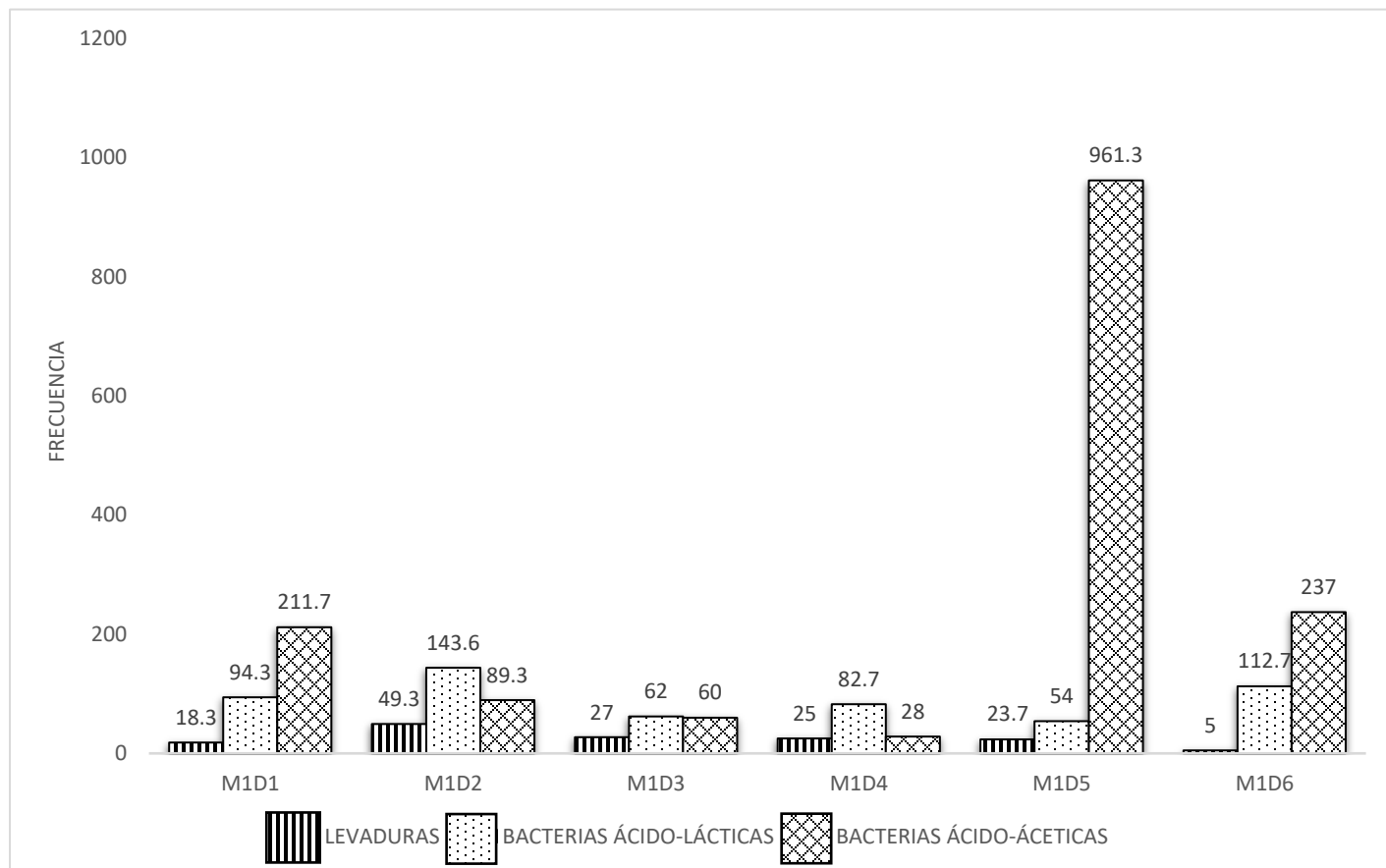


Gráfica 4.3. BACTERIAS ÁCIDO-ÁCÉTICAS, FRECUENCIA Vs COLONIAS. A. Muestra M1D1, B. Muestra M1D2, C. Muestra M1D3, D. Muestra M1D4, E. Muestra M1D5, F. Muestra M1D6.

La gráfica 3 muestra las gráficas de la frecuencia de las BAA obtenidas en las muestras tomadas durante el proceso de fermentación del mezcal en el palenque “Las Palmas”. En el día uno se tienen siete cepas la 001, 004, 002, 005, 003, 006 y 007 con una frecuencia de 62, 58, 56.7, 14, 13, 7.7 y 0.3 respectivamente, en el día dos se tienen siete cepas, pero aquí no se tienen la cepa 001 y aparece una nueva cepa, la 008, en el día tres se tiene la mayor diversidad, con un total de ocho cepas, 004, 002, 006, 001, 005, 003, 008 y 009 se observa que desaparece la cepa 007 y aparece una nueva cepa, la 009. En el día cuatro se tienen siete cepas de igual manera se observa la ausencia de la cepa 007, pero esta vez se tiene a la cepa 008, para el día cinco solo se cuenta con tres cepas; 001, 002 y 003 y aunque solo son tres la frecuencia de estas es alta; 129.3, 72 y 39.3 respectivamente y para el ultimo día, se tienen cinco cepas: 002, 004, 003, 005 y 006 con una alta frecuencia: 154, 37.3, 19.7, 19 y 7 respectivamente.

En la fermentación del mezcal del palenque “Las Palmas” se observa que en los primeros días de la fermentación hay una considerable participación de BAA que van apareciendo con poca frecuencia conforme pasa el tiempo de fermentación. En el día cinco solo aparecen tres colonias, pero con una frecuencia muy considerable, esto indica una mayor concentración de etanol, en los mostos, con lo que le da el óptimo crecimiento a este grupo de bacterias.

La dinamica poblacional de los consorcios microbianos que participaron durante el proceso de fermentacion del mezcal se muestra en la siguiente gráfica, donde nos expresa la relación de los consorcios microbianos que aparecieron en las muestras tomadas.



Gráfica 4.4. Dinámica poblacional de los consorcios microbianos presentes en la fermentación del mezcal en Las Palmas

La gráfica 4 nos muestra como la poblacion de las Levaduras, a partir de la muestra dos (M1D2) va en disminución y en la muestra seis (M1D6), la cantidad es muy pequeña, en las bacterias Ácido-Lácticas hay una variacion en las muestras y en las Bacterias Ácido-Acéticas en los ultimos dos dias de la muestras (M1D5,M1D6) hay un significativo crecimiento de la poblacion, esto es debido a que en ese momento habia una gran producción de etanol que es la fuente de alimento de las bacetrias acéticas, lo que nos indica que en esos dias de las muestras se tenía una mayor concentración de alcohol por lo tanto las levaduras fueron disminuyendo, debido a que no son tolerantes al etanol.

4.5 Unidades formadoras de colonias UFC

La UFC que es la frecuencia de aparición del número de colonias por ml, utilizando la fórmula

$$UFC = \text{numero de colonias} \times \text{dilucion signo contrario} \times \text{ml de muestra}$$

En donde la dilución es (1×10^5) y se utilizó 50 µl de muestra.

Las placas con colonias menores de 25 y mayores de 250 (como el caso de las bacterias ácido-acéticas en la muestra cinco (M1D5)) se contaron las colonias en porciones de la placa representativas de la distribución de colonias dividida en cuatro partes.

Tabla 4.2. Unidades formadoras de colonias UFC

UFC/ml	LEVADURAS ($\times 10^6$)	BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ($\times 10^7$)	BACTERIAS ÁCIDO-ÁCETICAS ($\times 10^7$)
M1D1	*37	19	42
M1D2	99	29	18
M1D3	54	12	12
M1D4	50	17	6
M1D5	47	11	*48
M1D6	*10	23	47

*Valor estimado

Las Unidades formadoras de colonias de las muestras de levaduras en placa en agar YPD, incubadas 72 horas a 28 °C.

Las Unidades formadoras de colonias de bacterias ácido-lácticas en placa en agar MRS, incubadas 48 horas a 30 °C.

Las Unidades formadoras de colonias de bacterias ácido-acéticas en placa en agar GYC, incubadas 48 horas a 30 °C.

4.6 Purificación

Se aislaron las colonias de las placas sembrados y se resembraron hasta obtener cepas puras.

Levaduras

De las diez colonias aisladas, se obtuvieron siete cepas purificadas de levaduras.

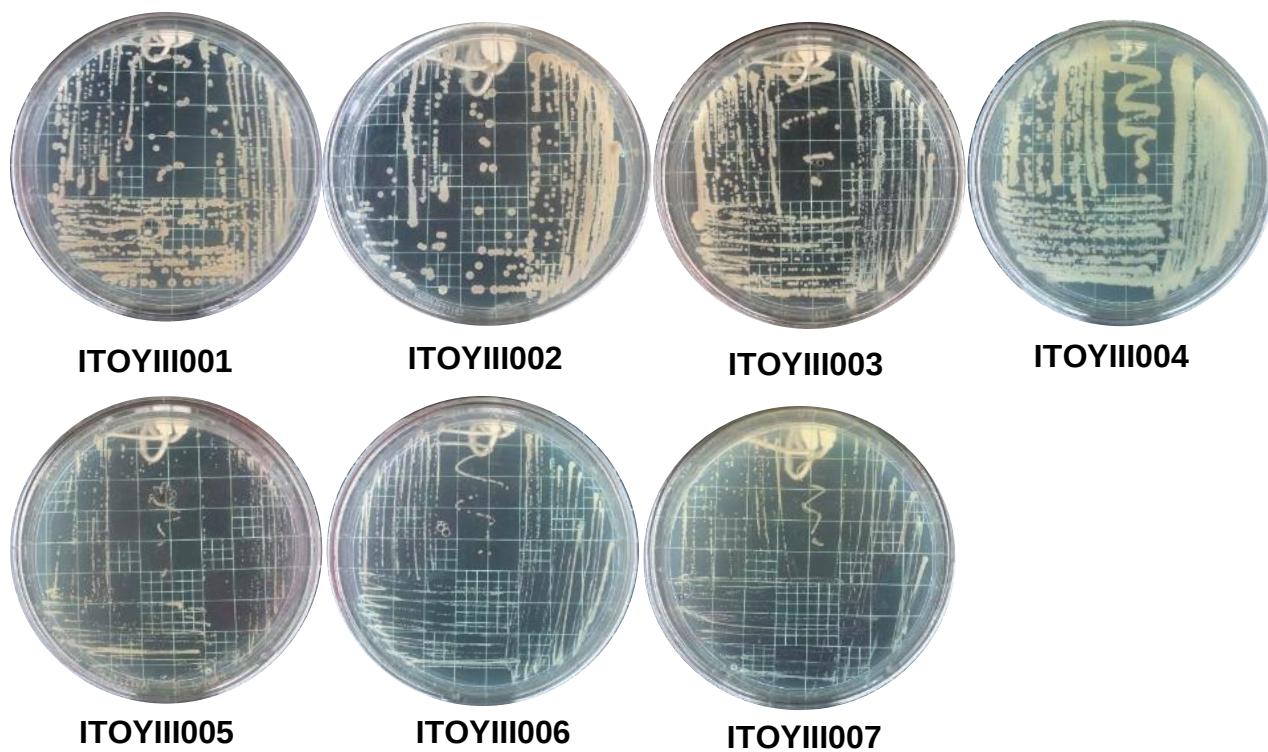


Figura 4.4. Cepas purificadas de levaduras.

Bacterias Ácido-Lácticas

Se obtuvieron siete cepas purificadas de bacterias ácido-lácticas

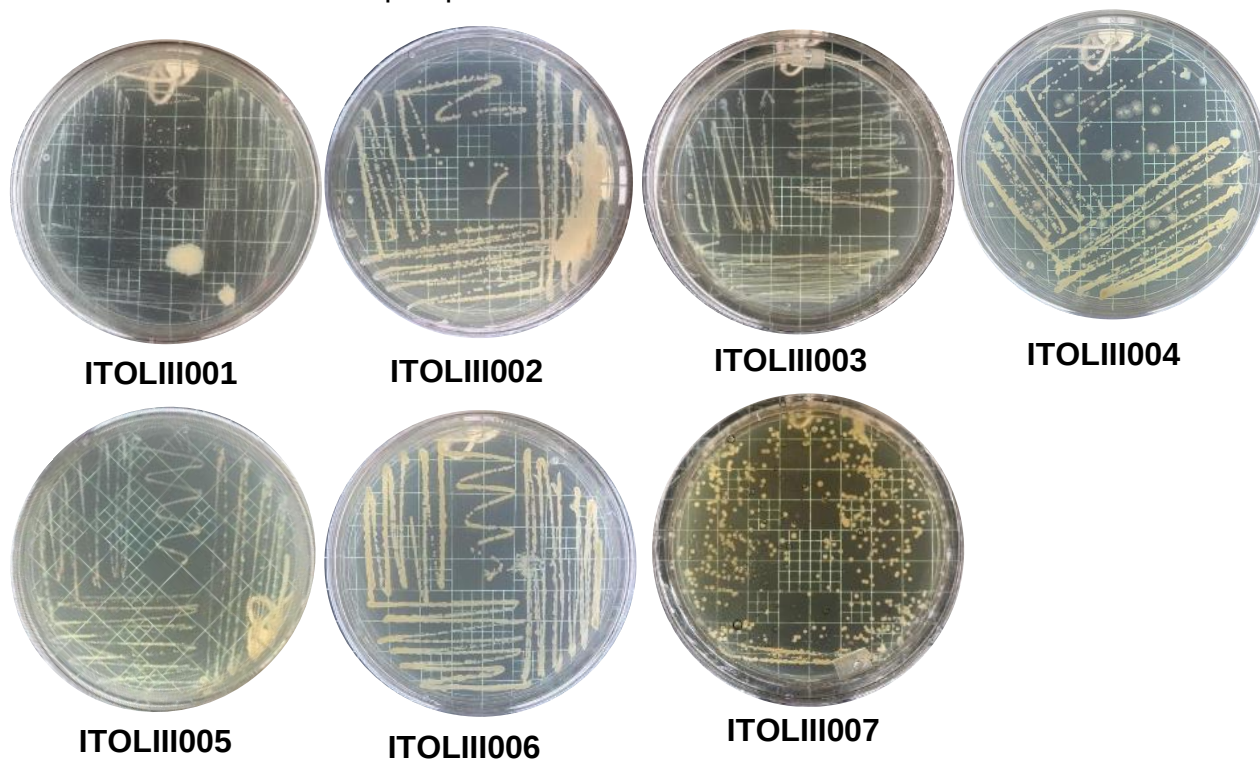


Figura 4.5. Cepas purificadas de bacterias ácido-lácticas.

Bacterias Ácido-Acéticas

Se aislaron nueve cepas y se resembraron hasta obtener cepas purificadas

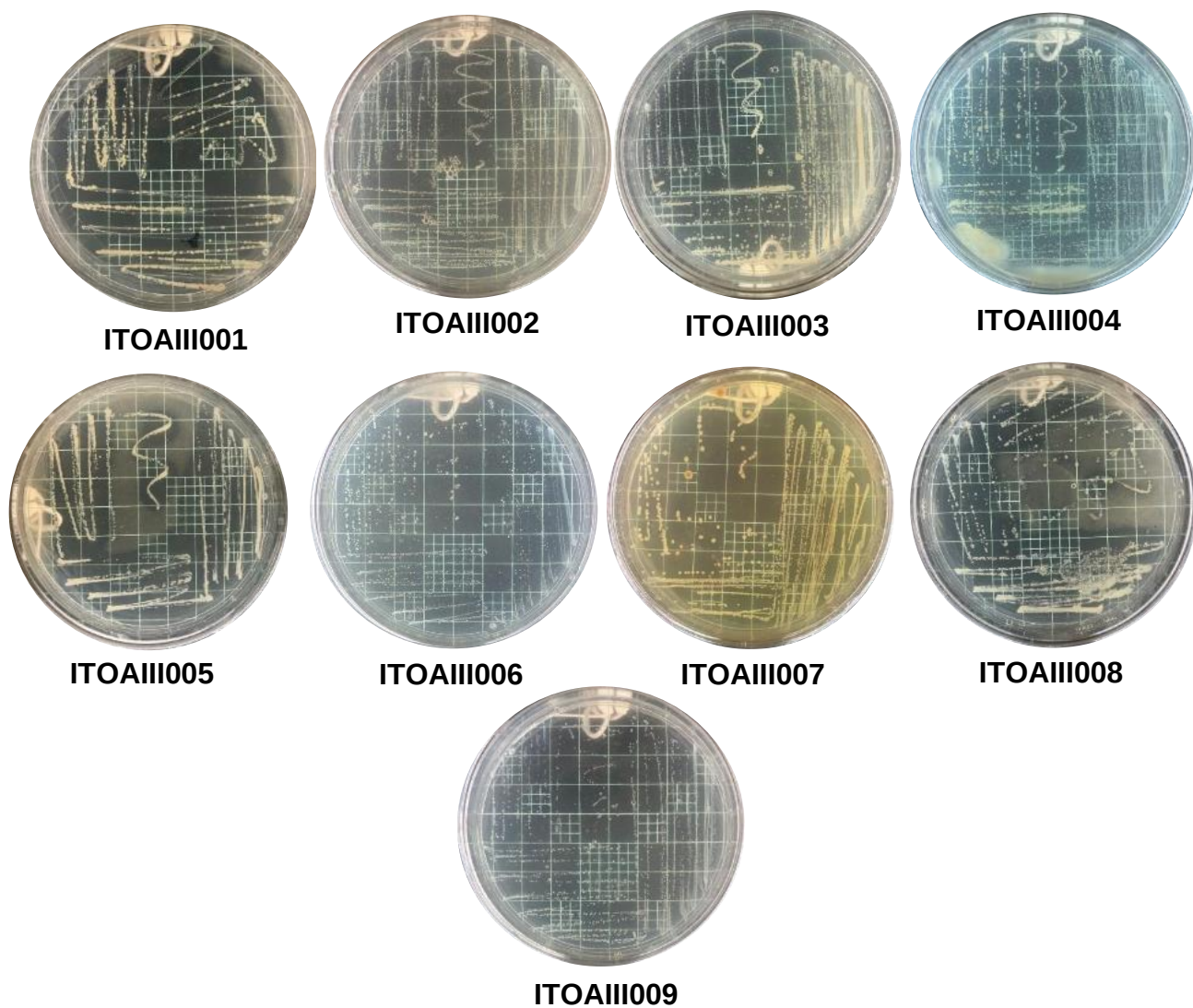


Figura 4.6. Cepas purificadas de bacterias ácido-acéticas.

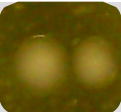
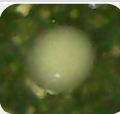
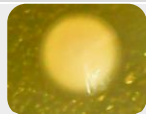
4.7 Identificación de levaduras y bacterias hasta género

4.7.1 Morfología macroscópica

Levaduras

De las diez colonias aisladas, se identificó tres colonias como hongos filamentosos, por lo que fueron descartados, quedando siete cepas de levaduras. La tabla siguiente muestra la morfología de las cepas de levaduras obtenidas.

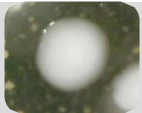
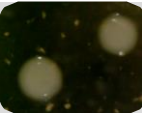
Tabla 4.3. Morfología colonial de levaduras, Agar en superficie

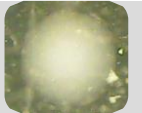
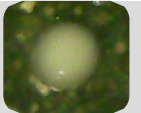
	ITOYIII001	ITOYIII002	ITOYIII003	ITOYIII004
TAMAÑO	Grande	Grande	Pequeño	Grande
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
FORMA	Circular	Circular	Puntiforme	Irregular
BORDE	Entero	Entero	Entero	Ondulado
ELEVACION	Elevada	Elevada	Convexa	Plana
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Rugosa
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Suave	Dura
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Seca
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Opaca	Traslúcida	Opaca
LUZ REFLEJADA	Brillante	Opaca	Brillante	Opaca
IMAGEN				
	ITOYIII005	ITOYIII006	ITOYIII007	
TAMAÑO	Pequeño	Pequeño	Mediano	
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	
FORMA	Puntiforme	Puntiforme	Circular	
BORDE	Entero	Entero	Entero	
ELEVACION	Convexa	Convexa	convexa	
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Cremosa	
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Traslúcida	Opaca	
LUZ REFLEJADA	Brillante	Brillante	Opaca	
IMAGEN				

Bacterias Ácido-Lácticas

La morfología de las siete cepas purificadas de las bacterias ácido-lácticas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.4. Morfología colonial de Bacterias Ácido-Lácticas, Agar en superficie

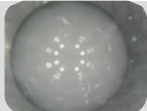
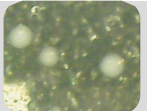
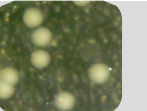
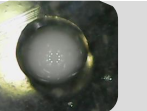
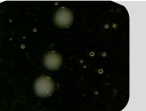
	ITOLIII001	ITOLIII002	ITOLIII003	ITOLIII004
TAMAÑO	Mediano	Pequeño	Pequeño	Mediano
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
FORMA	Circular	Circular	Circular	Circular
BORDE	Entero	Entero	Entero	Entero
ELEVACION	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Traslúcida	Opaca	Opaca
LUZ REFLEJADA	Opaca	Opaca	Brillante	Opaca
IMAGEN				

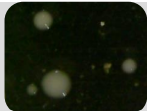
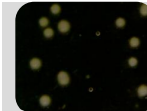
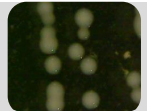
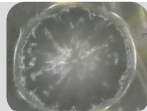
	ITOLIII005	ITOLIII006	ITOLIII007
TAMAÑO	pequeño	Pequeño	Grande
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco
FORMA	Puntiforme	Circular	Irregular
BORDE	Entero	Entero	Ondulado
ELEVACION	Elevada	Elevada	Convexa
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Suave
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Traslúcida	Traslúcida	Opaca
LUZ REFLEJADA	Opaca	Brillante	Opaca
IMAGEN			

Bacterias Ácido-Acéticas

Se tienen nueve cepas purificadas de las bacterias ácido-lácticas. La morfología se muestra en la siguiente tabla

Tabla 4.5. Morfología colonial de Bacterias Ácido-Acéticas, Agar en superficie

	ITOAI001	ITOAI002	ITOAI003	ITOAI004	ITOAI005
TAMAÑO	Mediano	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Pequeño
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
FORMA	Circular	Circular	Puntiforme	Circular	Puntiforme
BORDE	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
ELEVACION	Elevada	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Húmeda
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Brillante	Opaca	Traslúcida	Opaca
LUZ REFLEJADA	Opaca	Opaca	Brillante	Opaca	Opaca
IMAGEN					

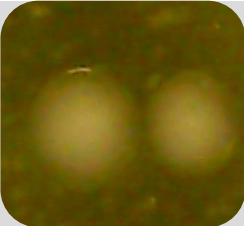
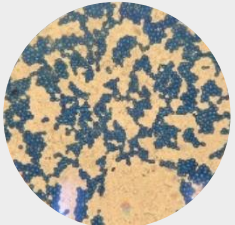
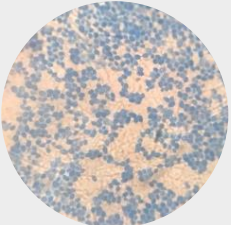
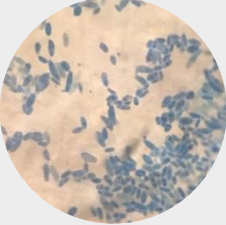
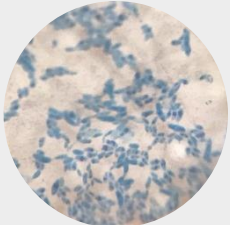
	ITOAI006	ITOAI007	ITOAI008	ITOAI009
TAMAÑO	Pequeño	Pequeño	Pequeño	Mediano
COLOR	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
FORMA	Circular	Puntiforme	Puntiforme	Irregular
BORDE	Entero	Entero	Entero	Ondulado
ELEVACION	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
SUPERFICIE	Lisa	Lisa	Lisa	Plegada
CONSISTENCIA	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Membranosa
ASPECTO	Húmeda	Húmeda	Húmeda	Seca
LUZ TRANSMITIDA	Opaca	Traslúcida	Opaca	Transparente
LUZ REFLEJADA	Opaca	Opaca	Brillante	Opaca
IMAGEN				

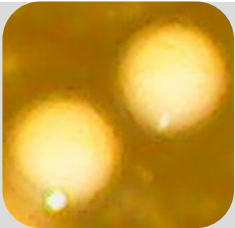
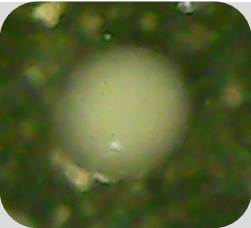
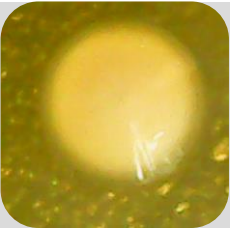
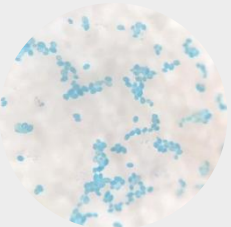
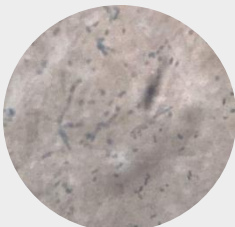
4.7.2 Morfología microscópica

Levaduras

Tinción simple de Azul de metileno

Tabla 4.6. Morfología microscópica de levaduras

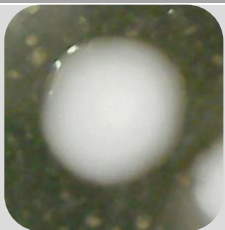
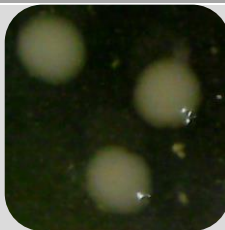
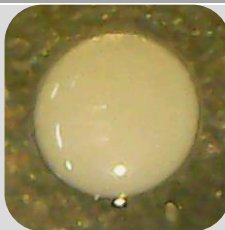
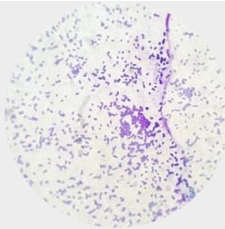
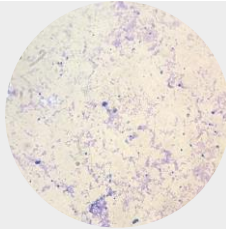
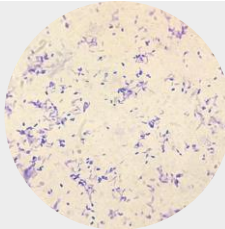
	ITOYIII001	ITOYIII002	ITOYIII003	ITOYIII004
Macroscópica				
Microscópico				
Género	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>

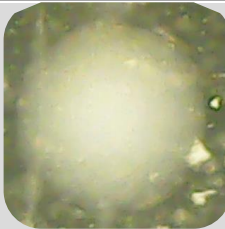
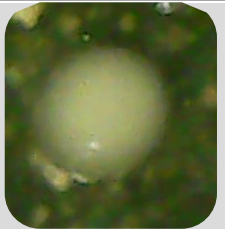
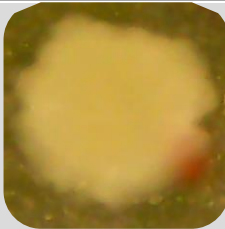
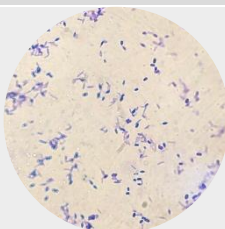
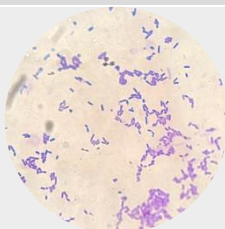
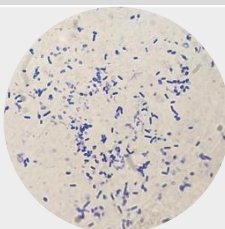
	ITOYIII005	ITOYIII006	ITOYIII007
Macroscópica			
Microscópico			
Género	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>

Bacterias Ácido-Lácticas

Tinción de Gram

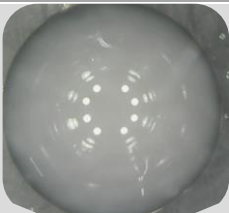
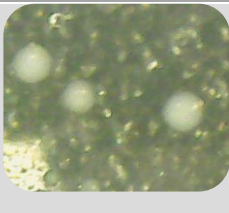
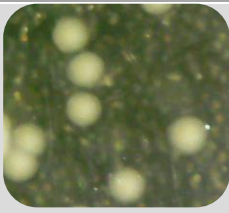
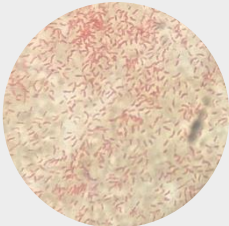
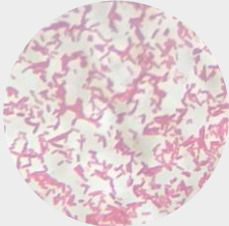
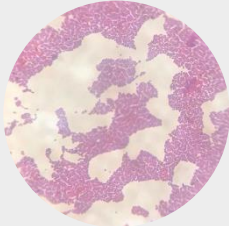
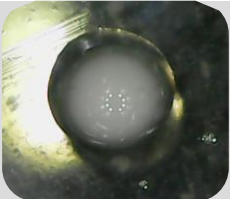
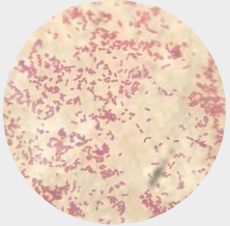
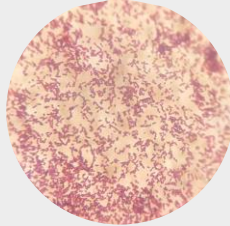
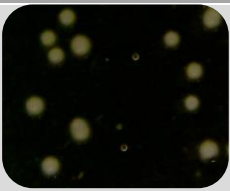
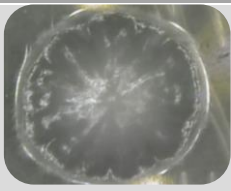
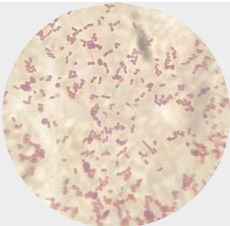
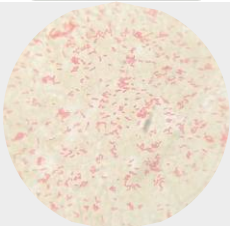
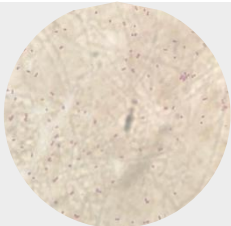
Tabla 4.7. Morfología microscópica de Bacterias Ácido-Lácticas

	ITOLIII001	ITOLIII002	ITOLIII003	ITOLIII004
Macroscópica				
Microscópico				
Género	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i>

	ITOLIII005	ITOLIII006	ITOLIII007
Macroscópica			
Microscópico			
Género	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>

Bacterias Ácido-Acéticas

Tabla 4.8. Morfología microscópica de Bacterias Ácido-Acéticas

	ITOAI001	ITOAI002	ITOAI003
Macroscópica			
Microscópica			
Género	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
	ITOAI004	ITOAI005	ITOAI006
Macroscópica			
Microscópica			
Género	<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>
	ITOAI007	ITOAI008	ITOAI009
Macroscópica			
Microscópica			
Género	<i>Acetobacter</i>	<i>Saccharobacter</i>	<i>Acidomonas</i>

CONCLUSIONES

Los microorganismos responsables de la fermentación del mezcal artesanal, sin duda alguna son variados, especialmente en esta región donde se encuentra una gran diversidad de flora y fauna.

Quienes participan mayormente en la producción de etanol son las levaduras, pero no solo hay etanol en el mezcal, es por eso que las bacterias aquí son importantes ya que el rol de estas es en la producción de otros compuestos químicos volátiles que forman parte de las características intrínsecas del mezcal.

En el análisis general obtenemos al principio de la fermentación mayor cantidad de las levaduras y bacterias lácticas, conforme aumentaba el tiempo de fermentación, éstos iban disminuyendo y aumentando las bacterias acéticas

Los primeros días de la fermentación quienes predominan más son las levaduras *Saccharomyces*, de las BAL los *Lactobacillus* y *Lactococcus* y de las BAA las *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Cuando la fermentación lleva cinco días comienzan a crecer en mayor cantidad las bacterias acéticas de las cuales se encuentran *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

Finalmente, cuando la fermentación ya está finalizando y los azúcares reductores totales es de menor cantidad, los microorganismos que se pueden encontrar ahí es menos puesto que son los etanoles tolerantes, estamos hablando de la levadura *Saccharomyces*

La presencia de estos grupos microbianos en la fermentación del mezcal artesanal indica riqueza en sus características organolépticas como sabor, cuerpo y aroma, es por ello que es importante conocer quiénes son y cuál es su principal producto brindado a esta bebida.

REFERENCIAS

- Aguirre, X., & Larson, J. (14 de mayo de 2005). Magueyes y diversidad. *Día Siete*(252). Obtenido de www.conabio.gob.mx
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2007). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at night sugar concentration . *J. of Appl. Microbiol*, 1123-1131.
- Barragan Ramírez, M. L. (2002). *Proyecto de inversión para el Procesamiento de Agave Mezcalero en la Mixteca Oaxaqueña*. Huajuapán de León: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Betancourt, S., Ayala, A., & Ramírez, C. (2014). Efecto del proceso de fermentación con bacterias ácido lácticas sobre propiedades reológicas de masas de maíz. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*, 503-511.
- Cabeza Herrera, E. A. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. *Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología*, 1-13.
- Cervantes Ramírez, M. C. (2002). *Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México*. México DF.: Instituto de Geografía, UNAM.
- Colunga GarcíaMarín, P., & Zizumbo Villareal, D. (2013). El Origen de los Mezcales. *Paisaje de México*, 38-44.
- CONEVAL. (2015). *Informe Anual Sobre La Situación de Pobreza y Rezago Social*. Oaxaca.
- Contreras, R. (29 de Septiembre de 2014). *Fermentación acética*. Obtenido de biología: <https://biologia.laguia2000.com/bioquimica/fermentacion-acetica>
- Curiel Avilés, U. G., Ruiz Martínez, A., Delfín García, R. D., & Gómez Díaz, J. (2017). El mezcal de Oaxaca, un cluster natural en etapa de crecimiento. *Revista mexicana de agronegocios*, 609-622.
- Eguiarte Fruns, L. E., & González González, A. (2007). De genes y Magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Revista Ciencias UNAM*, 28-35.
- Eguiarte, L. E., Equihua, C., & Espinosa Asuar, L. (2017). Agaves, agaves y más agaves. *Oikos*, 7-8.
- Fernández Pérez, R. (2015). *Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas*. Logroño: Tesis doctoral, Universidad de la Rioja.

- Financiera Rural. (2011). *Monografía del Mezcal*. Ciudad de México: Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial.
- Finanzas Oaxaca. (2012). *Plan municipal de desarrollo concepción Buenavista*. Oaxaca.
- García Mendoza, A. (2007). Los Agaves de México. *Ciencias*, 14-23.
- García Soto, M., Navarrete Bolaños, J. L., Jiménez Islas, H., Botello Álvarez, E., & Rico Martínez, R. (2003). Análisis del proceso de fermentación del Agave var salmiana para la obtención del mezcal. *Instituto Tecnológico de Celaya*, 2206-2211.
- García, A. J. (Septiembre de 2007). Los agaves de Mexico. *ejournal*, 15 - 23.
- Garibay, M. (2019). *Caracterización de la diversidad de levaduras presentes durante el proceso de fermentación del mezcal en estado de Guerrero*. Tesis, Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Chilpancingo de los Bravo, Gro.
- Godínez, C. (2012). *"Caracterización y eficiencia de la fermentación en la elaboración del mezcal potosino"*. Tesis, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultades de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina, San Luis Potosí.
- Hernández, I., & Barbero, F. (2008). Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación. *Viticultura*, 12-16.
- Hernandez, M. A. (2014). *"Determinación de los compuestos en mezcales oaxaqueños a través de CG y UV-Vis y el tratamiento de sus datos por técnicas quimiométricas"*. San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca: Universidad del Papaloapan.
- Hidalgo Reyes, M., Cruz Meza, P., & Perez Hernandez, L. M. (2010). Tecnificación del proceso de producción de mezcal, en el estado de Oaxaca, México. *XIV INTERNATIONAL CONGRESS ON PROJECT ENGINEERING*, 2137-2149.
- Jimenez, J. A. (2009). Identificación y cuantificación de algunos alcoholes en la destilación y rectificación del mezcal obtenido de agave potatorum zucc. pág. 54.
- Kirchmayr, M. R. (2014). *Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense*. Guadalajara, Jalisco: CIATEJ.
- Mabel Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

- Nogales, L. (1 de Abril de 2018). *9 especies de agaves mezcaleros en Oaxaca*. Obtenido de Mezcalología : <https://mezcalologia.mx/agaves-mezcaleros-de-oaxaca/>
- NOM-070-SCFI-2016. (s.f.). *NORMA Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016. Bebidas alcohólicas -Mezcal-Especificaciones*.
- Pérez Henández, E., Chavez Parga, M. d., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista colombiana de Biotecnología*, 148-164.
- Pérez, E., González-Hernández, J., Chávez-Parga, M., & Cortés-Penagos, C. (2013). Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de agave cupreata en la elaboración del mezcal. *Revista mexicana de ingeniería química*, 451-461.
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *alidad y Manejo Ambiental. Centro Nacional de Investigaciones de Café*. , 1-12.
- Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Armando Ulloa, J., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 1-16.
- Scheinvar Gottdiener, E. (2017). Agave, mezcal tradicional, cultura y diversidad. *Oikos*, 9-12.
- SEDESOL. (2015). *Catálogo de localidades*. Oaxaca.
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA*, 20-28.
- Vázquez , H., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica:Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 250-259.
- Vela, E. (2018). El Maguey, Breve historia. *Arqueología mexicana*, 10-11.
- Wacher Rodarte, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista digital universitaria unam*, 1607-6079.