

## El proceso de elaboración del mezcal

### Resumen

Para entender el proceso de elaboración del mezcal, es necesario conocer las reacciones bioquímicas que favorecen la producción de etanol y las reacciones que compiten disminuyendo su formación, además de entender los procedimientos a nivel práctico necesarios para optimizar dichas reacciones. El presente trabajo, pretende proporcionar la información esencial acerca de las rutas biosintéticas y de las etapas en el proceso que se ven afectadas por la falta de control en la temperatura, condiciones anaeróbicas y presencia de agentes proveedores de nitrógeno; así como algunas propuestas simples que podrían llegar a mejorar de manera significativa la producción de mezcal, incluyendo un mejoramiento de la calidad (bajo contenido de alcohol metílico, amílico e isoamílico).

### Abstract

To understand the process of elaborating mescal, it is necessary to know the biochemical reactions that facilitate the production of ethanol and the competing reactions that diminishing their formation, and also understand at a practical level the procedures that are necessary to optimise such reactions. This study sets out to provide essential information about biosynthetic routes and stages in the process that are affected by the lack of temperature control, anaerobic conditions and the presence of nitrogen-supplying agents; the study also offers some simple proposals that could lead to a significant improvement in the production of mezcal, including an improvement in quality (lower methyl, amyl and isoamyl content).

### Abstrait

Pour comprendre le processus d'élaboration du mezcal, il est nécessaire de connaître les réactions biochimiques qui favorisent la production d'éthanol et les réactions qui interagissent diminuant ainsi sa formation, en plus de comprendre les processus nécessaires au niveau pratique pour optimiser les dites réactions. Cette étude prétend divulguer l'information essentielle à propos des chemins biosynthétiques et des étapes dans le processus qui sont affectées par le manque de contrôle de la température, des conditions anaérobiques et de la présence d'agents porteurs de nitrógene ; telles que quelques propositions simples qui pourraient arriver à améliorer de manière significative la production de mezcal, en incluant une amélioration de la qualité (faible contenu d'alcool métallique, amylique et iso amylique).

- \* Ortiz-Bravo Eric G.
- \* Salas-Coronado Raúl

### ¿Qué es la fermentación alcohólica?

El término "fermentación alcohólica" se refiere a la transformación bioquímica de la glucosa y fructosa a etanol y dióxido de carbono de acuerdo a la ecuación de Gay-Lussac (Figura 1).

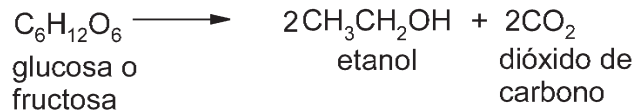
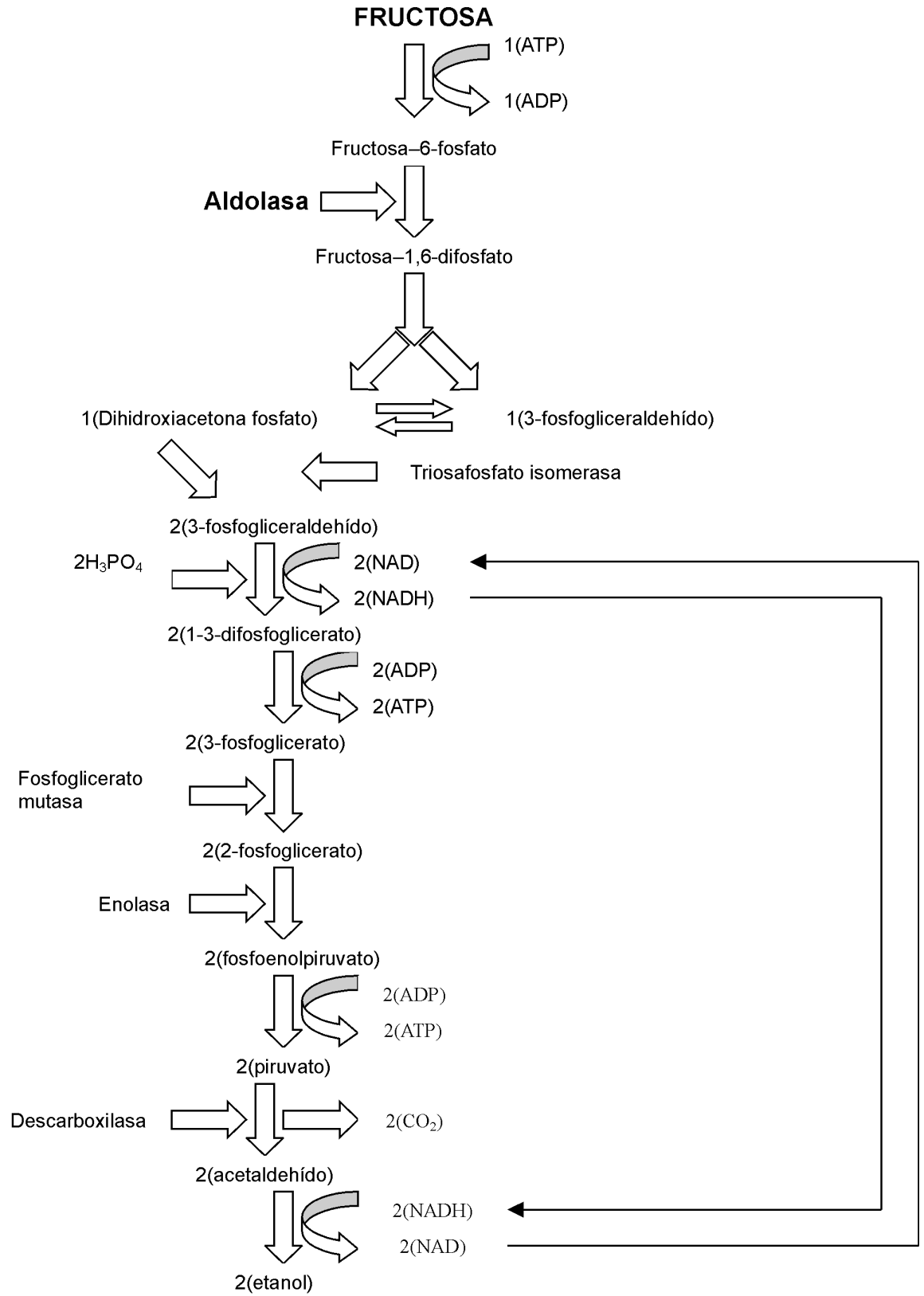


Figura 1. Ecuación de conversión de un monosacárido en etanol

Las levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, son los microorganismos más aptos para llevar a cabo la fermentación alcohólica, iniciando la degradación de los azúcares a ácido pirúvico vía glicólisis utilizando la ruta de Embden-Meyerhof (Figura 2). De manera subsecuente, el ácido pirúvico se descarboxila a acetaldehído seguido por su reducción a etanol en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y NADH2 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Reduced), una coenzima producida a partir de la vitamina B2, (Figura 3).

Figura 2. Ruta de Embden-Meyerhof

\* Instituto de Agroindustrias. Universidad Tecnológica de la Mixteca.



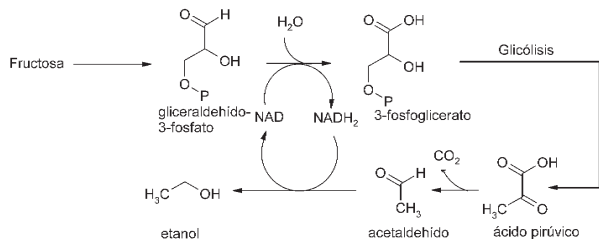


Figura 3. La fermentación alcohólica

La glicólisis y la fermentación alcohólica contribuyen de forma directa e indirecta a la formación de numerosos metabolitos. Muchos de estos metabolitos se producen en pequeñas cantidades, en comparación con el etanol y el dióxido de carbono, por lo que son denominados "metabolitos secundarios".

A partir del ácido pirúvico y del acetaldehído, las levaduras pueden formar ácido acético, láctico, málico, butírico, acetilmetilcarbinol y acetona. Otros subproductos generados son los aminoácidos, ácidos grasos, esteroides, ésteres etílicos de ácidos grasos, esteroides, alcoholes como el propanol, alcohol amílico e isoamílico, dióxido de azufre y en general, todos los compuestos volátiles producidos por las levaduras.

La precursora de muchos de estos productos secundarios es la acetil-CoA derivada del ácido pirúvico. La acetil-CoA puede dar origen a ácidos grasos de cadena media (caproico, caprílico, cáprico y láurico), ácidos grasos de cadena larga (mirístico, palmítico y esteárico), ácidos grasos insaturados de cadena larga (palmitoléico, oléico, linoléico y linolénico) y esteroides. Cuando el mosto, zumo extraído de la cabeza de un agave, es deficiente en estos compuestos, se sintetizan a partir de la acetil-CoA en presencia de oxígeno. Por el contrario, si ya existen en el medio, la levadura puede asimilarlos directamente y transformarlos en otras moléculas como los polifenoles, que son útiles para la regulación de los procesos de óxido reducción (Delfini y Formica, 2001).

## Selección del microorganismo

Las características deseadas de un proceso de producción industrial de etanol es altamente dependiente del organismo usado en la fermentación. Los organismos deben tener un rendimiento alto de producto por unidad de sustrato asimilado; una tasa alta de fermentación, una tolerancia importante al etanol;

una capacidad de mantenerse viable a altas temperaturas, estabilidad bajo condiciones adecuadas de fermentación y tolerancia a valores bajos de pH. Debido a estas características los microorganismos adecuados para la producción de etanol son las levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

Las levaduras son capaces de utilizar una gran variedad de sustratos dependiendo de la especie en cuestión. En general, estos organismos son capaces de crecer y fermentar de manera eficiente a pH entre 3.5-6.0 y temperaturas entre 28-35 °C. Aunque la tasa inicial de producción de etanol es alto a temperaturas elevadas (40 °C), el rendimiento total de la fermentación disminuye debido a una inhibición alta del etanol producido y la temperatura del reactor, que favorecen la deshidratación de la levadura (Kosaric, 1983).

## Selección del sustrato

Según su importancia técnica, los sustratos pueden ser divididos en tres tipos: ricos en azúcares simples (melazas, jugo de cañas, etc.); ricos en almidones (cereales, papa, etc.) y ricos en celulosa (madera, bagazos, etc.) (Esser y Schmidt, 1982 y Ostergaard, Olsson y Nielsen, 2000). Cuando se utilizan sustratos ricos en almidón o celulosa, se requiere efectuar una hidrólisis para fragmentar y transformar las cadenas de polisacáridos en azúcares simples (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

La hidrólisis se lleva a cabo a temperaturas y presiones elevadas (por lo general 120 °C y 15 psi). En algunas ocasiones se utiliza un ácido para catalizar, entre algunos de esos ácidos están el clorhídrico, sulfúrico, p-toluensulfónico y aminoácidos. Estos últimos no han sido muy adecuados debido a que bajo las condiciones de hidrólisis se favorecen transformaciones que originan compuestos coloreados. Estas transformaciones se conocen como reacciones de Maillard (Figura 4).

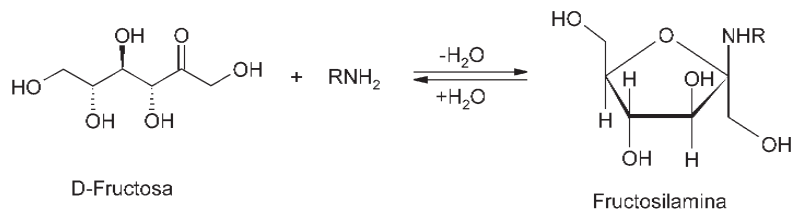


Figura 4. Reacciones de Maillard

## Clasificación de los nutrimentos requeridos por el microorganismo

### Nitrógeno

El contenido de nitrógeno de las levaduras es de aproximadamente el 10% del peso seco y como tal, representa un constituyente importante de cualquier medio de crecimiento. Por lo general, las levaduras son capaces de utilizar iones amonio como única fuente de nitrógeno. El sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  es la fuente de nitrógeno más utilizada en fermentaciones de carácter industrial (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

Las fuentes de nitrógeno más complejas, como mezclas de aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, bases simples (colina, betaína, etc.), ácidos grasos y material lipídico presentan una capacidad potenciadora del crecimiento y fermentación de las levaduras. La contribución de los aminoácidos constituye la mayor parte de estos efectos con los aminoácidos transportados activamente por sistemas generales y específicos. El transporte de iones amonio y aminoácidos es mutuamente inhibitorio debido a su competencia por el ATP (Adenosine Triphosphate) de la membrana.

Las mezclas de aminoácidos son fuentes de nitrógeno más eficientes que los iones amonio, debido a que los aminoácidos proveen de una cantidad adicional de carbono respecto a los iones amonio (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

La concentración de nitrógeno provisto por aminoácidos, así como la relación carbono/nitrógeno, regulan la actividad de la ruta glicolítica. De forma adicional, los aminoácidos sirven como buffer contra efectos de inhibición iónica y regulan las reacciones de óxido-reducción (Mauricio y col., 2001).

Las purinas, pirimidinas y péptidos son asimilados fácilmente por las células de la levadura e incrementan los rendimientos de biomasa. La contribución de estas fuentes adicionales de nitrógeno es compleja, sin embargo su omisión disminuye el rendimiento de la fermentación (Greenfield, Pamment y Jones, 1981 y Albers y col., 1996).

### Fósforo

El fósforo se provee en forma de fosfatos ( $\text{PO}_4^{2-}$ ). Su función es la de controlar la síntesis de lípidos y carbohidratos, además de mantener la integridad de la

pared celular. El fosfato se asimila por la célula mediante el mecanismo de transporte activo.

### Azufre

Además del azufre, el sulfato inorgánico puede ser utilizado. En este caso, el sulfato es reducido a metionina dentro de la célula. La metionina, sin embargo, es muy costosa como fuente de nitrógeno, por lo que se utiliza generalmente el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

## Elementos traza

Los elementos traza pueden dividirse en tres categorías:

- i) Macroelementos (K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl) requeridos en concentraciones entre 0.1-1 mM.
- ii) Microelementos (Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, V) requeridos en concentraciones entre 0.1-100  $\mu\text{M}$ .
- iii) Inhibidores (Ag, As, Bi, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se, Te). Cuando su concentración excede el intervalo entre 10-100  $\mu\text{M}$  afectan el crecimiento y la fermentación de manera adversa.

En general, la función de los elementos traza está relacionada con la protección celular contra condiciones ambientales adversas y con la regulación del pH celular.

## Vitaminas

Las vitaminas regulan el metabolismo de las levaduras, su función es enzimática y como tales, no se consumen en la fermentación, aunque pueden ser inactivadas o degradadas. Los requerimientos esenciales de vitaminas dependen de cada especie, siendo la biotina y el ácido pantoténico esenciales para todas las especies de *Saccharomyces* (Greenfield, Pamment y Jones, 1981).

## Procedimiento tradicional de elaboración del mezcal

El mezcal es una bebida alcohólica regional que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos preparados directa y originalmente con los azúcares<sup>1</sup> extraídos de las cabezas maduras de los agaves, previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no.

En el estado de Oaxaca la región productora del Mezcal está integrada por los municipios de Sola de

1 Polímeros de fructosa conocidos con el nombre de fructanos.

Vega, Miahuatlán, Yautepec, Santiago Matatlán, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán. Los agaves que se utilizan principalmente para la obtención de mezcal son: *angustifolia* Haw y *potatorum* Zucc, comúnmente conocidos como espadín y tobalá, respectivamente (NOM-070-SCFI-1994).

La producción de mezcal es un proceso que inicia con el cultivo del agave y finaliza con el envasado del producto. La producción empieza con la recolección y recepción de la materia prima (Figura 4), que en una primera etapa se fracciona y se somete a cocimiento con la finalidad de convertir los azúcares complejos en azúcares simples. La operación se lleva a cabo en hornos de forma cónica e inversa y que están recubiertos de piedras con la finalidad de conservar el calor (Figura 5).



Figura 4. Recolección de la materia prima.



Figura 5. Piñas de agave cocido en horno tradicional.

El cocimiento se realiza con calor directo (utilizando leña) representando pérdidas de azúcares, ya que en ocasiones una parte de la cabeza del agave (piña) no

se cuece y la piña que tiene contacto con las piedras se quema, produciendo mieles amargas. Además, el sabor a humo que queda en el maguey cocido puede conferirle un sabor desagradable al mezcal. En esta etapa del proceso se pierde una parte importante de los azúcares reductores de la materia prima.

La siguiente parte del proceso es la molienda, o machacado de la piña, que por tradición se realiza en una pila de piedra donde se coloca el agave cocido y sobre este se hace pasar una piedra que va tirando un caballo (Figura 6) y cuando el palenquero, encargado de la fábrica, considera que el proceso ha terminado (lo cual puede observarse por la formación de una pasta suave) se procede a transferir la materia prima machacada ( 150 kg) a las tinas de fermentación (Figura 7).



Figura 6. Molienda de las piñas.



Figura 7. Fermentación del mosto.

Después de haber realizado la molienda se le adiciona agua a  $\approx 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y sulfato de amonio ( $\approx 1\text{ kg}$  por tina), se deja reposar por un periodo de 24 h y se

llena la tina con agua fría (extraída de un pozo a una temperatura de 15 °C), mezclándose manualmente durante 2 h, utilizando un palo de madera y un trinche metálico. Posteriormente se deja reposar durante tres días o hasta que termine el proceso de fermentación, el cual se evalúa de forma empírica guiándose por la intensidad del ruido que se genera en el fermentador, debido a la formación de CO<sub>2</sub>.

Por último se realiza una destilación en alambiques de cobre (Figura 8); para llenar estos alambiques se transporta el mosto de las tinas de fermentación a los alambiques utilizando carretillas y botes de plástico, la destilación se realiza con calor directo (utilizando leña), el condensador o serpentín se encuentra inmerso en un estanque de agua a temperatura ambiente, éste se calienta conforme va transcurriendo el tiempo de destilación, por el intercambio de calor que existe con el serpentín, llegando a una temperatura hasta de 87 °C. Es importante mencionar que estas condiciones al no controlarse afectan la calidad del producto, disminuyendo la cantidad de compuestos volátiles característicos del sabor y aroma del mezcal.



Figura 8. Destilación y obtención del mezcal.

Algunos estudios relacionados con la optimización y caracterización química del mezcal

En estudios realizados por Santiago-García y col. (2002) se demostró que la fermentación del agave tobalá incrementó la generación de etanol con respecto a los azúcares aprovechados (rendimiento del 48%), al compararlo con la fermentación del agave espadín (rendimiento del 29%). Sin embargo, al efectuarse la comparación del contenido de alcoholes superiores (2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol) se encontró una cantidad menor en el mosto de agave tobalá que en el

agave espadín. Estos resultados se atribuyeron a las diferencias en las concentraciones de compuestos nitrogenados encontradas en el mosto de ambos agaves. Por otra parte, el uso de sulfato de amonio permite acelerar el proceso de fermentación y es una práctica común en los palenques. Trabajos realizados por el mismo autor (Santiago-García y col., 2002), demostraron que la eficiencia en la formación de alcohol con respecto al contenido inicial de azúcares en mosto de agave espadín utilizando sulfato de amonio fue de 32.2%, en tanto que la eficiencia fermentativa para mostos del mismo agave sin este compuesto fue de 20.8%. Estos resultados se atribuyen a una mayor cantidad de nitrógeno proporcionado por el sulfato de amonio.

## Conclusiones

Actualmente el mezcal es una de las bebidas nacionales que se exporta, en caso particular el estado de Oaxaca es el número uno a nivel nacional. Pero dicha bebida no reúne todas las características que el mercado internacional exige respecto a la calidad (contenido de metanol, alcoholes superiores, ésteres, minerales, etc.), por lo que es muy importante implementar un sistema de calidad adecuado que no involucre la "industrialización" del producto, y que sea capaz de mantener constantes las características de sabor, aroma y apariencia. Esto se lograría controlando las temperaturas de cocción, fermentación y destilación, además de llevar un monitoreo del tiempo en cada una de las operaciones.

También es necesario establecer parámetros de calidad que se extiendan a la evaluación de los compuestos antes mencionados y no sólo a componentes elementales como el etanol y metanol.

Por otro lado, se necesita encontrar un procedimiento que ayude a mejorar la eficiencia de conversión de azúcares a etanol pero sin favorecer el aumento de metanol y alcoholes superiores. Esto puede lograrse a partir del uso de nutrimentos ricos en nitrógeno y azufre tales como los aminoácidos.

## Agradecimientos

Agradecemos a la fábrica de mezcal Chagoya por la información proporcionada, incluyendo las fotografías presentadas en este artículo.

## Bibliografía

- ALBERS E., LARSSON C., LIDÉN G., NIKLASSON C. Y GUSTAFSSON L.  
1996 "Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62, 3187-3195.
- BADUI S.  
1993 *Química de los alimentos*". 3ª Ed. Editorial Pearson, México. 75-82.
- DELFINI C. Y FORMICA J.  
2001 "Wine: Microbiology, Science and Technology". Editorial Maecel Inc. Nueva York, Estados Unidos.
- ESSER K. Y SCHMIDT U.  
1982 "Alcohol production by biotechnology". *Process Biochemistry*. Vol. 17, 46-49.
- GREENFIELD P. F., PAMMENT N. Y JONES R. P.  
1981 "Alcohol fermentation by yeast: the effect of environmental and other variables", *Process Biochemistry*. Vol. 16, 42-49.
- KOSARIC N., WIECZOREK A., CONSENTINO G., MAGEE R. Y PRENOSIL J.  
1983 "Biotechnology Volume 3: Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources". Capítulo 3a, 257-266.
- MARCILLA-MARGALLI, N. Y LÓPEZ, M. G.  
2002 "Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 50, 806-812.
- MAURICIO J., VALERO E., MILLÁN C. Y ORTEGA J.  
2001 "Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeast". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 49, 3310-3315.
- NELSON D. L. Y COX M. M.  
2001 "Principios de Bioquímica de Lehninger". 3ª Ed. Editorial Omega, Barcelona, España.
- NOM-070-SCFI-1994, (1994), "Bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones".
- OSTERGAARD S., OLSSON L. Y NIELSEN J. Ç  
2000 "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 64, 38-41.
- SANTIAGO-GARCÍA P., VERA-GUZMÁN A., TERÁN-SANGERMÁN U., BAUTISTA P. B. Y LÓPEZ M. G.  
2002 "Estudio comparativo de la fermentación natural e inducida del mosto de agave (*Agave angustifolia* Haw), en la elaboración tradicional del mezcal". *Memorias del Segundo Foro de la Agroindustria del Mezcal, Oaxaca, Oaxaca*.
- SANTIAGO-RIVERA L. Y LÓPEZ M. G.  
2002 "Evaluación química del mosto de *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc durante la fermentación en la elaboración del mezcal oaxaqueño". *Memorias del Segundo Foro de la Agroindustria del Mezcal, Oaxaca, Oaxaca*.
- SCHWARTZBERG H.  
1992 "Physical chemistry of foods". Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Estados Unidos. 599-626.

