

# MICROORGANISMOS QUE PRODUCEN LOS SABORES Y AROMAS DEL MEZCAL DE PAPALOMÉ (*Agave potatorum* Zucc.) DE SAN PEDRO, TEOZACOALCO, OAXACA.

Imelda Ramírez-Cuevas<sup>1</sup>, Claudia López-Sánchez<sup>2</sup>,  
Lina Pliego-Marín<sup>1</sup>, Felipe de Jesús Palma-Cruz<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Departamento de Ingenierías. Ex Hacienda de Nazareno s/n, San Jesús Nazareno, Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71233.

<sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Ing. Víctor Bravo Ahuja No.125, esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030. Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

<sup>3</sup>Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Oaxaca. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Av. Ing. Víctor Bravo Ahuja No.125, esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030. Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México.

Autor de correspondencia: [claudia.lopez@itoaxaca.edu.mx](mailto:claudia.lopez@itoaxaca.edu.mx) [Claudia López Sánchez]





## RESUMEN

La producción de mezcal en Oaxaca es mayormente artesanal, la fermentación se produce de forma espontánea, sin necesidad de un inóculo iniciador; y por una gran diversidad de levaduras y bacterias, provenientes del ambiente que rodea a la fábrica de producción, conocida comúnmente en Oaxaca como "palenque". En este estudio, se colectaron muestras de mosto durante la etapa de fermentación en San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán Oaxaca; a las cuales se les midió el pH, la temperatura y los sólidos solubles disueltos. En el laboratorio, se aislaron y purificaron levaduras, bacterias ácido-lácticas [BAL] y bacterias ácido-acéticas [BAA] en medios selectivos. Las cepas obtenidas, se sometieron a caracterización morfológica colonial y microscópica, y a la identificación fenotípica mediante pruebas bioquímicas. De lo anterior, se determinaron tres géneros de levaduras: *Candida*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*; cuatro géneros de bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*; y cinco géneros de bacterias ácido-acéticas: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*.

**Palabras clave:** mezcal, fermentación, levaduras, BAA/BAL.

## ABSTRACT

The production of mezcal in Oaxaca is mostly artisanal, fermentation occurs spontaneously, without the need for an initiating inoculum; and by a great diversity of yeasts and bacteria, coming from the environment surrounding the production factory, commonly known in Oaxaca as "palenque". In this study, must samples were collected during the fermentation stage in San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán Oaxaca; which were measured pH, temperature and dissolved soluble solids. In the laboratory, yeasts, lactic acid bacteria [LAB] and acetic acid bacteria [AAB] were isolated and purified in selective media. The strains obtained were subjected to colonial and microscopic morphological characterization, and phenotypic identification by biochemical tests. From the above, three genera of yeasts were determined: *Candida*, *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*; four genera of lactic acid bacteria: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella*; and five genera of acetic acid bacteria: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconobacter* and *Gluconacetobacter*.

**Key words:** mezcal, fermentation, yeasts, LAB/AAB.



## Introducción

El mezcal es un producto ancestral y emblemático de México, engloba una serie de conocimientos y saberes, prácticas culturales, creencias y usos de una región en particular, lo cual le confiere al territorio y al producto una riqueza que es valorizada y valorada por el consumidor. La producción de mezcal tradicional es una de las actividades económicas que mantiene a comunidades enteras, siendo esta, una de las principales fuentes de ingresos en Oaxaca. De acuerdo con la NOM-070-SCFI-2016, el mezcal se define como “una bebida alcohólica destilada mexicana, cien por ciento de agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de agaves cocidos, cosechados en el territorio bajo la Denominación de Origen”. Esta bebida alcohólica se obtiene a partir de la destilación de mostos fermentados de *Agave spp.* En Oaxaca, la especie de *Agave* más empleadas para la elaboración de esta bebida alcohólica es *A. angustifolia* Haw. también conocido como maguey espadín [Palma Cruz, 1991].

Sin embargo, el maguey papalomé (*Agave potatorum* Zucc.) también se ha usado de forma predominante y con bastante aceptación, principalmente para la elaboración de un mezcal con propiedades sensoriales muy particulares [García Mendoza, 2010]. El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas destila-

das son producidos por un gran número de compuestos volátiles y no-volátiles, los cuales forman una mezcla compleja que define estos atributos sensoriales, y consecuentemente la aceptación por el consumidor. Se sabe que ciertos volátiles ejercen un mayor impacto en la percepción del sabor de todas las bebidas destiladas. Estas características se las proporcionan los diferentes grupos funcionales como los aldehídos, alcoholes, ésteres, ácidos, cetonas, furanos, entre otros.

Los aldehídos son compuestos químicos que van a proporcionar aromas a hojas verdes, hierbas o frutas cuando son de cadena corta o tonos amargos desagradables conforme aumenta la longitud de la cadena. Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal, principalmente los ésteres de ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos orgánicos producen sabores agrios, además los ácidos volátiles imparten aroma. Las cetonas tienen un impacto en el sabor de acuerdo con la longitud de la cadena. Los furanos son usualmente formados de carbohidratos por la reacción de Maillard, el 5-hidroxiacetilfurfural tiene un aroma suave a caramelo, heno y tabaco y el furfural tiene un aroma y sabor a caramelo y cereal [Vera Guzmán *et al.*, 2009].

Dentro del proceso de fermentación de esta bebida tradicional, se presentan poblaciones espontáneas

de bacterias y levaduras que se benefician entre sí para producir componentes que le otorgan diversidad de aromas y sabores al mezcal tradicional [López Sánchez *et al.*, 2020]. Las bacterias del ácido-láctico [BAL] y las bacterias del ácido- acético [BAA] logran destacar entre estas poblaciones espontáneas.

La fermentación es la etapa más importante en el proceso de elaboración del mezcal artesanal, ya que en esta etapa la bebida adquiere sus propiedades características; razón por la cual, se estudió a los consorcios microbianos que son los responsables de dicha acción, según lo han confirmado Jiménez Pacheco *et al.* [2021]. Para identificar a los microorganismos que componen una comunidad microbiana, se han utilizado enfoques multifásicos, aprovechando las ventajas que ofrecen, ya que combinan la caracterización de genotipos con su expresión fenotípica, debido a la gran diferencia que existe con la identificación taxonómica tradicional fenotípica entre morfotipos similares observados en diferentes condiciones ambientales [Espinoza Martínez *et al.*, 2022].

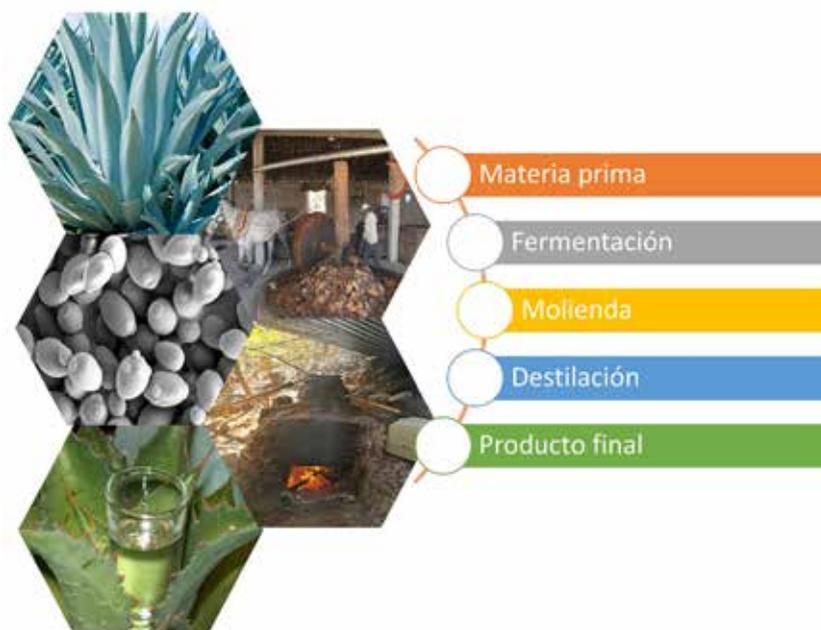


Figura 1. Proceso de producción del mezcal

## 2

### Desarrollo del tema

La presente investigación se llevó a cabo en el palenque (fábrica de mezcal), ubicado en el municipio de San Pedro Teozacoalco, Nochixtlán, Oaxaca; en donde se tomaron alícuotas de los mostos de la fermentación de *Agave potatorum* Zucc., a los cuales se les midió *in situ* los siguientes parámetros: sólidos solubles expresados en grados Brix, temperatura y el pH, las muestras se guardaron en frascos estériles. Posteriormente se trabajó en el laboratorio de Control Ambiental del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica ubicado en el Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Oaxaca, en donde se determinaron los azúcares reductores totales [ART] y directos [ARD], por el método de Lane-Eynon [AOAC 1990].

Utilizando tres medios selectivos: Agar Dextrosa y Papa [PDA] para levaduras, Man Rogosa Sharpe y Glucosa [MRS] para bacterias ácido lácticas [BAL], y Extracto de Levadura y Carbonato de Calcio [GYC] para bacterias ácido acéticas [BAA]; se aislaron varias cepas de los microorganismos presentes en el consorcio microbiano del mosto fermentado, y, se purificaron empleando los mismos medios de cultivo con los que se aislaron; posteriormente, se caracterizaron macroscópicamente las colonias de las cepas purificadas y microscópicamente sus células. Por último, cada una de las diferentes cepas aisladas, se sometieron a una caracterización fisiológica mediante pruebas bioquímicas para levaduras, BAL y BAA.

## 3

## Resultados

Se obtuvieron las muestras de los mostos de *Agave potatorum*, en las tinas de fermentación en el palenque ubicado en San Pedro Teozacoalco, y se les midieron el pH, la temperatura y los sólidos solubles disueltos en grados Brix; así como los azúcares reductores directos (ARD) y totales (ART)

### Parámetros fisicoquímicos

Muestra	pH	°Brix	Temperatura
Mosto de maguey papalometl [ <i>Agave potatorum</i> Zucc.]	4.54	7.2	24.1 °C

### Azúcares reductores

	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
ART (%)	0.85	1.02	0.93
ARD (%)	0.68	0.68	0.68

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los mostos de la fermentación del mezcal.

### Caracterización morfológica macro y microscópica de cepas de levaduras aisladas.

Las levaduras son organismos unicelulares y forman colonias, por lo que al realizar la tinción simple fue relativamente fácil el reconocimiento de las diferencias de las células; en los ocho aislamientos logrados, se reconocieron cepas correspondientes a tres géneros: *Saccharomyces* como el más común, *Schizosaccharomyces* quien se caracteriza por tener células cilíndricas y los conidios tienen una base muy ancha, y *Candida* que presenta pseudohifas. La morfología colonial de las colonias de estas levaduras mostró que en su mayoría fueron de color blanco, redondas e irregulares, su consistencia suave y de grandes tamaños.



### Pruebas bioquímicas para identificar levaduras

Las ocho cepas distintas de levaduras, aisladas de los mostos de *Agave potatorum*, se sometieron a diferentes pruebas bioquímicas consistentes en la fermentación de diez carbohidratos diferentes: glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa, lactosa, sorbitol, manosa, manitol, maltosa y xilosa (tabla 2); en donde se destaca que las cepas A, G y H fermentaron glucosa, fructosa y negativo en lactosa y sorbitol, lo cual es característico de levaduras del género *Saccharomyces*; en tanto que el resultado negativo, mostrado por las cepas C, D, E y F, en la fermentación de galactosa, lactosa, sorbitol, manitol y xilosa, son una de las particularidades fisiológicas que exhiben las levaduras del género *Candida*. Y la respuesta positiva de la fermentación de ocho de los diez azúcares probados, indicaron que la cepa B corresponde a levaduras del género *Schizosaccharomyces* (tabla 2).

Tabla 2. Pruebas de fermentación de carbohidratos para la identificación de levaduras

		Cepas de levaduras							
CARBOHIDRATOS		A	B	C	D	E	F	G	H
GLUCOSA		+	+	+	+	+	+	+	+
FRUCTOSA		+	+	+	+	+	+	+	+
GALACTOSA		-	+	-	-	-	-	+	-
SACAROSA		+	+	+	+	+	-	+	-
LACTOSA		-	-	-	-	-	-	-	-
SORBITOL		-	-	-	-	-	-	-	-
MANOSA		+	+	+	+	+	+	+	+
MANITOL		-	+	-	-	-	-	-	-
MALTOSA		-	+	+	+	+	+	-	+
XILOSA		-	+	-	-	-	-	-	-

A, G y H *Saccharomyces*      C, D y E *Candida*      B. *Schizosaccharomyces*



### Pruebas bioquímicas para identificar bacterias ácido-lácticas (BAL)

Para la identificación de las bacterias ácido-lácticas presentes en los mostos de *Agave potatorum*, las cepas se sembraron en los medio de cultivo Elliker (también conocido como agar Lactobacilli), M17, M5, y se observó la producción de nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), cuando crecían en el medio MRS, así como su respuesta a la Catalasa. A partir de lo cual se determinó que las ocho cepas aisladas corresponden a cinco géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella*.

### Pruebas bioquímicas para identificar bacterias ácido-acéticas

Para la identificación de las bacterias se tuvieron en cuenta los resultados de las siguientes doce pruebas bioquímicas: 1) reacción a la catalasa, 2) oxidación de acetato; 3) producción de ácido a partir de: manosa, glucosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, galactosa, glicerol, etanol, propanol; 4) crecimiento en agar manitol, 5) crecimiento en agar glutamato, 6) crecimiento en agar metanol como fuente de carbono, 7) formación de dihidroxiacetona a partir de glicerol, 8) crecimiento en 1% nitrato de potasio, 9) crecimiento en 0.35% (v/v) de ácido acético, 10) crecimiento en 30% de glucosa, 11) oxidación de etanol a dióxido de carbono y, 12) crecimiento en 3% de cloruro de sodio. Y después del exhaustivo escrutinio fisiológico se determinó que las 11 cepas aisladas de los mostos de la fermentación del maguey papalomé corresponden a cinco géneros de BAA: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter* y *Asaia*.

Los microorganismos encontrados en este trabajo son de gran importancia durante el proceso de la fermentación del mezcal, y con ello se contribuye a reafirmar que Oaxaca cuenta con una gran diversidad de microorganismos favorables no sospechados en la producción del mezcal, tal y como otros autores lo han hecho en otras regiones de la misma entidad federativa: López-Sánchez et al. [2020 y 2023]; Espinoza-Martínez et al., [2020 y 2023]; Maza-López et al. [2023]; Lazcares- Contreras et al. [2023]; Santiago-Santiago et al. [2023].

# 4

## CONCLUSIONES

En esta investigación se lograron identificar, por métodos convencionales, a doce géneros microbianos responsables en la fermentación del mosto de *Agave potatorum* Zucc., de ellos tres son levaduras, cuatro bacterias ácido-acéticas y cinco bacterias ácido-lácticas. Entre ellas se encuentran *Saccharomyces* que es la más común entre las levaduras, pero de igual manera obtuvimos otros géneros como *Candida* y *Schizosaccharomyces*; en tanto que, de las BAL, se identificaron a los géneros *Lactobacillus*, *Strepto-*



*coccus*, *Leuconostoc* y *Weissella*; y de las BAA los géneros *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*. Es importante resaltar que este trabajo es el punto de partida para realizar estudios de identificación molecular de las cepas en estudio, así como los análisis con espectrometría de masas sobre los compuestos químicos que son los responsables de los aromas y sabores de los mezcales artesanales y ancestrales de Oaxaca.



# REFERENCIAS

AOAC [Association of Official Analytical Chemists]. [1990]. Official Methods of Analysis: Changes in Official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement [Vol. 15].

Espinoza-Martínez, V. A., Jiménez-Pacheco, A., Palma-Cruz, F. J., & López-Sánchez, C. [2020]. Diversidad microbiana durante la fermentación del proceso de producción de artesanal de mezcal en Coixtlahuaca, Oaxaca. Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 35 [86]: 68-74.

Espinoza-Martínez V. A., López-Sánchez, C., Palma-Cruz F. J. [2022]. Identificación polifásica de consorcios microbianos de la fermentación del mezcal en

Oaxaca. Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 37 [94]: 142-146.

Espinoza-Martínez V. A., Álvarez-Gutiérrez P. E., Palma-Cruz F. J., Enríquez-Valencia R., Ramírez-López, M. P., López-Sánchez C., Vázquez-López H. G. [2023]. Influence of the biotechnological process of mezcal fermentation on yeast diversity in four palenques of Oaxaca, México. Beverages 9: 99.

García-Mendoza A. J. [2010]. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. Acta Botánica Mexicana 91: 71-93.

Jiménez-Pacheco, A., Espinoza-Martínez, V., López-Sánchez, C. & Palma-Cruz, F.J. [2021]. Dinámica

poblacional del consorcio microbiano de la fermentación del mezcal de Concepción Buenavista, Coixtlahuaca, Oaxaca. Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales 1[1]: 190.

Lazcares- Contreras H. L., López-Sánchez C., González-Martínez C. Y. & Palma-Cruz F. J. [2023]. Levaduras y bacterias lácticas asociadas con agave convallis en la producción de mezcal artesanal en Oaxaca. Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 38 [10]: 199-202.

López-Sánchez, C., Espinoza-Martínez V. A., Palma-Cruz F. J. [2020]. Consorcio microbiano de la fermentación del mezcal artesanal en San Dionisio Ocotepc, Oaxaca. Revista del Centro de Graduados

e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 35 [83]: 44-47.

Maza-López B., López-Sánchez C., Galván-Espinosa J., Ramírez-López M. P., y Palma-Cruz F. J. [2023]. Bacterias involucradas en la producción de mezcal tradicional en Oaxaca con *Agave angustifolia* Haw. Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 38 [99]: 132-138.

Palma-Cruz, F. J. [1991]. El género *Agave* L. y su distribución en el estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura en Biología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala- UNAM. 171 p.

Santiago-Santiago B. A., López-Sánchez C., y Palma-Cruz, F. J.

[2023]. Levaduras y bacterias lácticas asociadas a la fermentación del mezcal tradicional de *Agave rhodacantha* y *Agave marmorata*. Revista del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida 38 [101]: 161-164.

Vera Guzmán, A. M., Santiago García, P. A., & López, M. G. [2009]. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. Revista Fitotecnia Mexicana 32[4]: 273-279.