

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Especialización en Biotecnología

TESINA

I.A. Diana Berenice Martínez Rodríguez

Asesor: Dr. José Ramón Verde Calvo

Marzo 2012

Lector: M. en F.P. Frida Pura Malpica Sanchez

Caracterización de componentes volátiles en destilados de agave y caña con fines de apoyo a la denominación de origen de tequila.

Antecedentes:

La situación actual de las bebidas alcohólicas en México es el resultado de diversas y numerosas reuniones del sector competente, a lo largo de muchos años se han ido regulando las bebidas alcohólicas para evitar malas prácticas de manufactura que se reflejen en el perjuicio a la salud del consumidor.

Existen Organismos nacionales que se encargan de elaborar las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y Normas Mexicanas (NMX), las NOM son normas obligatorias que indican las buenas prácticas de manufactura, incluyendo la información comercial y límites máximos de parámetros fisicoquímicos, en cambio, las NMX son normas de calidad, donde se establecen límites mínimos y máximos de los parámetros antes mencionados garantizando la inocuidad del producto.

Entre las bebidas más reconocidas del País se encuentra el Tequila, producto protegido por una Denominación de Origen (D.O.) desde Mayo de 1997⁽¹⁾. El 14 de Abril del 2011 se anunció que la producción de bebidas o cualquier producto elaborado de manera ilícita y sin apego a las normas oficiales mexicanas se ha integrado como un delito en el Código Penal en su Artículo 252 Fracción XXV. En el contexto de la cadena productiva Agave-Tequila, el Consejo Regulador del Tequila (CRT) apoyó la iniciativa en el congreso del Estado desde hace un año aproximadamente (2).

La problemática del consumidor, es que está expuesto a creer que adquiere un Tequila, cuando en la etiqueta se declara destilado de agave y esto crea confusión y una deslealtad comercial con la industria tequilera.

Aún con la protección de la Denominación de Origen, que impide la competencia desleal y el fraude de otros países, no existe un control con los productores nacionales debido a que la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, que define actualmente a este producto, no establece un análisis que permita determinar una clara diferencia entre el tequila y otras bebidas alcohólicas, ni diferencias entre los diversos tipos de tequilas existentes. En esta norma no existe algún análisis fisicoquímico con el que se puede diferenciar entre un tequila 100 % agave, que se elabora con azúcares exclusivamente provenientes de *Agave Tequilana Weber* variedad azul y un tequila, que se puede elaborar hasta con un 49 % de azúcares diferentes a los provenientes del agave.

Los análisis fisicoquímicos que propone la norma para diferenciar al tequila, dan parámetros muy similares, por lo que la diferenciación se dificulta si únicamente se aplica este criterio. Lo anterior podría resultar en la venta de tequilas etiquetados como 100 % Agave sin serlo en realidad, y no estar violando la NOM-006-SCFI-2005 pero sí engañando a los consumidores (1).

Detrás de cada botella de alcohol adulterado hay toda una red de mafias y comerciantes sin escrúpulos que utilizan marbetes de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP), hologramas y sellos de autenticidad falsificados, así como maquinaria para rellenar botellas recicladas. Las consecuencias de la adulteración y el contrabando de alcohol van desde la evasión de impuestos hasta daños graves a la salud de las personas que lo ingieren.

El 60 por ciento de las bebidas alcohólicas en el mercado están adulteradas, por el contrabando y la piratería, afirmó la diputada Guadalupe García Almanza (Convergencia), secretaria de la Mesa Directiva. Subrayó que estas bebidas falsificadas, contienen metanol, ácido nítrico o sulfúrico, formol y piedra alumbre, que afectan el funcionamiento del cerebro. (3). Los efectos pueden ser fatales en los consumidores, los síntomas empiezan con fuertes dolores de cabeza, mareo, ceguera, náuseas, vómito, nerviosismo, ansiedad y resaca intensa, hasta el fallecimiento si el producto contiene metanol y el afectado no es atendido con oportunidad, agregó. Las entidades donde más se producen bebidas adulteradas son el Distrito Federal, el Estado de México y Jalisco, mientras que Cancún, es el principal consumidor de éstas, enfatizó (3).

El comisionado federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios de la Secretaría de Salud, Miguel Ángel Toscano Velasco, y el procurador general de Justicia del Distrito Federal, Miguel Ángel Mancera, presentaron a los medios de comunicación los avances del programa "Mala Copa" que se aplica en bares, cantinas, centros de espectáculos, restaurantes y salones de baile de la ciudad de México.

El titular de la COFEPRIS anunció que en el marco de la campaña permanente del gobierno federal contra el comercio ilegal de bebidas alcohólicas, a nivel nacional se aseguraron más de 80 mil litros de licores falsificados durante 2010 y en el primer operativo de este año que se llevó a cabo en Jalisco, se incautaron más de 55 mil litros de presunto tequila (4).

Por su parte, el procurador Miguel Ángel Mancera manifestó que los buenos resultados del programa se deben a la eficaz coordinación entre autoridades federales y locales, así como a la participación de las organizaciones empresariales (4).

En base a lo anterior se pretende controlar a las bebidas alcohólicas destilados de agave en su elaboración y esto es estableciendo que este producto solo se puede obtener a partir de la fermentación del agave y de la caña (juntos) para posteriormente destilar el mosto obtenido.

Introducción:

Algunos estudios que se han realizado para estudiar la composición volátil de diversos tipos de bebidas alcohólicas como el tequila y los vinos, son las siguientes:

1) Prado *et al.*, (2005) estudió los compuestos volátiles presentes en las diferentes etapas del proceso de producción del tequila. Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó el método de extracción líquido-líquido por lote y el extracto se analizó por cromatografía de gases masas (identificación) y cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (cuantificación). En este estudio se separaron 562 compuestos de las diferentes etapas del proceso de elaboración del tequila, de los 562 se identificaron y cuantificaron 410. (5)

2) Aguilar-Cisneros *et al.*, (2003) evaluaron la autenticidad del tequila. En este estudio se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con relación isotópica (SPMEHRGC-IRMS) para comparar tequilas blancos, reposados y añejos auténticos con tequilas comerciales y otro tipo de bebidas espirituosas. Por otro lado esta técnica les permitió saber el origen del etanol, es decir, de cual materia prima provenía en base a la relación isotópica que guardan los elementos carbono y oxígeno del etanol. (6)

3) Vallejo-Córdoba *et al.*, (2005) identificaron los compuestos volátiles de tequilas blancos, reposados, añejos y extra-añejos. La técnica utilizada para la extracción de compuestos volátiles fue la micro extracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases (SPME-CG-MS). El método de identificación fue espectrometría de masas. Se identificaron 17 compuestos. (7)

4) Benn y Peppard (1996), estudiaron el aroma característico de tres tipos de tequilas (blanco, reposado y añejo). Los métodos de identificación fueron: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases acoplada a olfatometría (GC-O). Se analizaron diferentes clases de tequila: blanco, reposado y añejo, en donde el tequila blanco presentó un mayor número de compuestos volátiles. Se identificaron alrededor de 175 compuestos volátiles. El análisis sensorial les permitió determinar los compuestos que tienen mayor poder odoractivo en el tequila; estos son isovaleraldehído, alcohol isoamílico, damascenona, 2-feniletanol y vainillina. (8)

5) Estarrón-Espinosa (1997) identificó los principales compuestos volátiles que caracterizan al tequila blanco 100% de Agave. Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó el método de extracción líquido-líquido en continuo. Los extractos se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (identificación) y cromatografía de gases con detector de ionización de flama (cuantificación). (9)

6) Pinal *et al.*, (1997) estudiaron el proceso de fermentación del Tequila. La variedad de levadura, la temperatura (30 – 35 °C) y la relación de carbono-nitrógeno pues tienen una influencia significativa en la producción de alcoholes superiores. Sin embargo, otros parámetros como la fuente de nitrógeno y las cantidades de levaduras inoculadas tienen poca o nula influencia en la producción de los compuestos responsables de algunas de las propiedades organolépticas del tequila. De acuerdo con el estudio cinético que realizaron, concluyeron que la producción de etanol empieza en las primeras horas del proceso de fermentación. También se encontró que los alcoholes superiores que determinaron, isoamílico e isobutílico, empiezan a formarse cuando los niveles de azúcar se han disminuido considerablemente, y continúan produciéndose, durante varias horas una vez que la fermentación alcohólica ha finalizado. (10)

7) Arrizon et al. (1995) caracterizaron las levaduras utilizadas en el proceso de fermentación y sus propiedades. Realizaron un estudio comparativo de las levaduras de diferentes orígenes utilizadas en las industrias del tequila. En su estudio efectuaron fermentaciones a concentraciones altas y bajas de azúcares de jugo de *Agave tequilana*. Comprobaron que las diferentes levaduras utilizadas tenían un comportamiento diferente a las altas y bajas concentraciones de azúcares. De ello se deduce que es importante utilizar un tipo específico de levadura para el tequila para obtener resultados óptimos. (11)

El Tequila es una bebida alcohólica destilada, obtenida de la fermentación y destilación del jugo obtenido de la piña del maguey de nombre científico *Agave Tequila Weber*, variedad azul.

La fermentación alcohólica es un proceso biológico en plena ausencia de oxígeno, originado por la actividad de microorganismos que procesan los hidratos de carbono (azúcares: como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono y moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de bebidas alcohólicas, como el vino, la cerveza, la sidra, etc. Aunque en la actualidad se empieza a sintetizar también etanol mediante la fermentación a nivel industrial para ser empleado como biocombustible (12).

Las levaduras son microorganismos unicelulares (generalmente de forma esférica) de un tamaño que ronda los 2 a 4 μm y que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras. Son organismos anaeróbicos facultativos, es decir que pueden desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno. El 96% de la producción de etanol la llevan a cabo diferentes especies de levaduras, entre las que se encuentran principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulaspota* y *Zymomonas mobilis* (13). Los microorganismos responsables de la fermentación son de tres tipos: bacterias, mohos y levaduras. Cada uno de estos microorganismos posee una característica propia sobre la fermentación, en algunos casos son capaces de proporcionar un sabor característico al producto final (como en el caso de los vinos o cervezas). A veces estos microorganismos no actúan solos, sino que cooperan entre sí para la obtención del proceso global de fermentación. En el caso específico del Tequila existe un solo estudio publicado (14) sobre una caracterización exhaustiva de las levaduras presentes en la elaboración de la bebida. Este autor identificó 10 géneros: *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Iwatcheski*. Un elemento importante que debe mencionarse es que las 700 especies de levaduras identificadas hasta hoy, representan únicamente una fracción de la biodiversidad de las levaduras presentes en el planeta. Al nivel de especie, la más estudiada es *Saccharomyces cerevisiae* cuyo genoma ya secuenciado presenta 6 000 genes y sólo se conoce la función de la mitad (15).

Bioquímica de la reacción de fermentación

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta necesita de enzimas para su completo funcionamiento. A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse:

como una glicólisis (*vía Embden-Meyerhof*) de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa



Se puede ver que la fermentación alcohólica es desde el punto de vista energético una reacción exotérmica, se libera energía (16).

Durante la glucólisis en la fermentación de los mostos elaborados a partir de jugo de agave cada molécula de fructosa o de glucosa se convierte en dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono. La conversión teórica de 180 g de azúcar en 92 g de etanol (51.1 %) y 88 g de dióxido de carbono (48.9 %) se puede obtener únicamente en ausencia de crecimiento, de producción de otros metabolitos y de pérdidas de etanol ligadas a la evaporación. En una fermentación modelo, en condiciones óptimas, cerca del 95 % de los azúcares se convierte en alcohol y dióxido de carbono, 1 % en biomasa y 4 % en otros productos como el glicerol (16).

La fermentación alcohólica se produce por regla general antes que la fermentación maloláctica, aunque existen procesos de fermentación específicos en los que ambas fermentaciones tienen lugar al mismo tiempo. La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración sobre los 0,16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) incluso en presencia de exceso de oxígeno (aeróbico), este es el denominado efecto Crabtree, este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación (16).

Agave.

La planta de la familia de las Agavaceas, de hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada, de color azulado, cuya parte aprovechable para la elaboración de Tequila es la piña o cabeza. La única especie admitida para los efectos de la NOM, es *Agave tequilana weber variedad azul*, cultivada dentro del territorio comprendido en la Declaración (19).

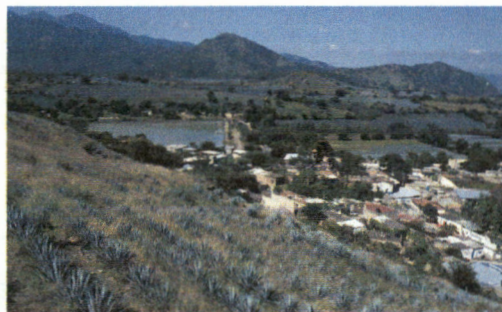


Tequila:

Las menciones más antiguas sobre la existencia del mezcal o *Agave tequilana Weber var. Azul* y sus diferentes usos se remontan a la época precortesiana; figuran en varios códices que se mantienen hasta la fecha como fuentes históricas de referencia. Se sabe que la palabra tequila proviene del nombre náhuatl *tequi*, que significa cortar y la que significa lugar; por lo que tequila significa etimológicamente "lugar en donde se corta o lugar en donde se paga tributo" (17).



El agave o maguey necesita un clima semidesértico para su desarrollo y tarda en madurar cerca de 10 años, floreciendo una sola vez en su vida.



Una vez que está maduro la jima consiste en cortar las hojas de la planta hasta la base, para así dejar libre su corazón o piña, que se arranca por el jimador con un instrumento llamado coa.



Las piñas pueden pesar entre 20 y 90 kilogramos y tras cortarlas por la mitad se cuecen a presión con vapor de agua para convertir los azúcares en sustancias fácilmente fermentables. Una vez cocido el agave, se muele y convierte en pasta y se le extraen los líquidos o mieles que se separan del bagazo. El jugo, se puede mezclar con azúcares de caña, hasta con 49 por ciento del total, antes de la fermentación, en la cual los

azúcares se transforman en etanol y otros compuestos, que generan el sabor y el olor característicos del tequila (17).



El género *Agave* posee dos subgéneros: *Littaea* y *Agave* propiamente dicho. El primero sirve de ornato, mientras que el segundo se cultiva para elaborar bebidas fermentadas (pulque) y destiladas (tequila y mezcal). Aunque existen alrededor de 250 especies de agave, de los cuáles 150 crecen en México, solamente 9 son cercanos a la *variedad Azul Tequilana Weber*, la única utilizada para la elaboración del autentico tequila. Esta planta es exclusiva de todo Jalisco, 6 municipios de Guanajuato, 8 de Nayarit, 30 de Michoacán y 11 de Tamaulipas (18).



Es el principal producto económico del estado de Jalisco en México. Se utiliza como única materia prima básica para la elaboración del Tequila.

De acuerdo con la definición prevista en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005 Bebidas Alcohólicas – Tequila – Especificaciones, Tequila es la “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un Productor Autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la Declaración, derivados de las cabezas de *Agave tequilana weber variedad azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos por esta NOM y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío (19). El Tequila es un líquido que, de acuerdo a su clase, es incoloro o coloreado cuando es madurado o cuando es abocado sin madurarlo (19).

Operaciones Unitarias:

Son las etapas del proceso de elaboración del Tequila, en las cuales las materias primas sufren cambios químicos, bioquímicos y físicos, hasta obtener un producto determinado en cada una de ellas. Entre otras existen las siguientes etapas básicas de dicho proceso: jima, hidrólisis, extracción, formulación, fermentación, destilación, maduración y en su caso, filtración y envasado (19).



Fermentación: Preparado el mosto para fermentación éste se inocula con un cultivo microbiano, el cual puede ser una cepa pura de levadura *Saccaromyces cerevisiae* o bien de alguna otra especie. Una vez que el mosto está formulado con la cantidad deseada de azúcares y nutrientes se puede iniciar la fermentación. En la industria tequilera, la gran mayoría de las empresas sigue utilizando la fermentación espontánea, a veces por desconocimiento de las ventajas del desarrollo de un inóculo o también por política de la empresa por querer conservar una fermentación totalmente natural. La levadura más recomendada es una aislada del mismo mosto. La velocidad de la fermentación depende de diferentes factores, como la composición del mosto, las condiciones de operación (fermentación con o sin bagazo) pero sobre todo de la cepa de levadura utilizada. Cuando la fermentación se inicia de manera espontánea esta etapa puede tener una duración de hasta cinco días. Con la adición de una levadura previamente desarrollada en un medio apropiado conocido como cultivo madre puede tener una duración de 20 horas a 3 días (20).



Este proceso fermentativo puede durar entre 12 y 72 horas, dependiendo del grado de alcohol deseado que puede ser de 6% para tequila mixto y 4.5% para tequila 100%. Terminada la etapa de fermentación, se deja en reposo el mosto para propiciar la generación de compuestos aromáticos importantes en el producto (20).



Correlación de compuestos volátiles del tequila con su origen.

Todas las bebidas alcohólicas presentan sustancias volátiles que se encuentran en muy baja concentración, pero suficiente para dar a la bebida su aroma y sabor distintivo. A estos compuestos se les llama congenéricos y son compuestos orgánicos volátiles.

Estos congenéricos tienen su origen, principalmente en la fermentación realizada por las levaduras, aunque hay compuestos que su origen es la materia prima, y se afectan o benefician por procesos posteriores a la fermentación como en la destilación y el añejamiento. Con el fin de proteger la autenticidad y evitar e identificar adulteraciones en las bebidas alcohólicas, se han realizado estudios donde se han correlacionado compuestos congenéricos con la autenticidad de las bebidas. En el caso de los whiskies se han realizado análisis mostrando un mayor contenido de lactonas y algunos compuestos azufrados, los cuales se utilizan para diferenciarlos de otras bebidas alcohólicas. El vodka tiene mayor cantidad de compuestos volátiles de nitrógeno, en el ron hay compuestos derivados de naftaleno y los ésteres etílicos derivados de ácidos de 8 a 16 carbonos. Otras sustancias utilizadas para relacionar a las bebidas con su origen son los alcoholes derivados de los terpenos y en el caso del brandy y el ron, los fenoles. Los aldehídos en los vinos sirven para distinguir el origen de la uva y el grado de añejamiento. El perfil de alcoholes superiores y compuestos volátiles se ha relacionado con su autenticidad, origen y tiempo de añejamiento. En el vino, se han realizado estudios para relacionar su composición general con la variedad y el tipo de uva con la que se elaboran, su procedencia geográfica, proceso de elaboración y añejamiento. Sin embargo los congenéricos se encuentran en la fracción conocida como aceite de fusel, que se conforma con alcoholes superiores, ácidos, acetales, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, furanos, fenoles, pirazinas, compuestos azufrados y terpeno, siendo los ésteres la fracción más importante. En base a estudios previos, se han encontrado que el tequila contiene diversos ésteres etílicos y que algunos de ellos, pueden tener relación con la materia prima con la que fue elaborado. Algunos de dichos compuestos son el pentadecanoato de etilo, hexadecanoato de etilo, octadecenoato de etilo y el octadecedienoato de etilo. Los ésteres etílicos presentes en mayor cantidad en los tequilas blancos y 100 % agave son, el hexadecanoato de etilo, octadecedienoato de etilo y el dodecanoato de etilo. Los datos arrojados de este estudio sugieren que hexadecanoato de etilo y

octadecedienoato de etilo podrían ser usados como compuestos marcadores o representantes del contenido de azúcares provenientes del agave. Sin embargo, recomiendan antes, continuar los estudios para comprobar lo antes sugerido (1).

Formación de componentes volátiles durante la fermentación del tequila mediante levaduras aisladas del jugo de agave.

La producción de aromas complejos durante la fermentación del tequila depende del tipo de levadura utilizado, Aguilar *et al.* En el 2008 (21), usan cuatro variedades de levaduras aisladas del jugo de agave, tres de las cuatro variedades fueron identificadas como *Saccaromyces cerevisiae* (MTLI 1, MALI 1 y MGLI 1) y una como *Kloeckera apiculata* (MALI 2). los aromas complejos producidos fueron cuantificados por cromatografía de gases (FID). Se encontró que los acetaldehídos tienen la mayor concentración cuando la temperatura de fermentación es controlada (35°C) y antes de que el 50 % del azúcar fuera consumido. La variedad *S. cerevisiae* produce acetato etilo al menos en la misma concentración de 5 mg/L y la *K. apiculata* produce seis veces (30 mg/L) más que *S. cerevisiae* independientemente de la temperatura de fermentación. La razón y la cantidad de 1 propanol, alcohol amílico e isobutanol producidos fueron afectados por el tipo de levadura usada. La variedad *K. apiculata* produce 50 % menos de alcoholes superiores que la variedad *S. cerevisiae*. El resultado obtenido muestra que las levaduras aisladas juegan un importante papel en el sabor del tequila y sugieren que mezclas de esas levaduras pueden ser usadas para producir un tequila con un único y deseable aroma (21).

Destilación: Existen dos formas de realizar la destilación: mediante la utilización de alambiques o en columnas, siendo el primero el más usual. En el primer caso, regularmente se utiliza un tándem de dos alambiques de cobre, material que ayuda a eliminar compuestos sulfurados indeseables (22).

En el primer alambique, el mosto fermentado se calienta con vapor y se destila hasta tener un producto intermedio ordinario, con una concentración de alcohol de entre el 25 y el 30%, al cual se le han removido los sólidos, parte del agua y las cabezas y colas. Las primeras contienen componentes volátiles que destilan antes que el etanol, debajo de los 80 grados centígrados, como metanol, isopropanol y acetato de etilo, y las segundas contienen alcoholes menos volátiles como amílico y algunos ésteres. En el segundo alambique, el ordinario se destila nuevamente para enriquecer el contenido alcohólico hasta el 55%, además de refinar considerablemente el producto. Este tequila al 55% contenido de alcohol, se considera un producto final, ya que de hecho es el que se comercializa a granel. Antes de envasarse, este destilado se diluye con agua desionizada, para lograr productos finales de 35% a 43% contenido de alcohol.



Al utilizar columnas se emplean hasta tres en tándem. En este caso el mosto entra a la columna por la parte superior, a contracorriente con vapor, con lo que se evaporan los compuestos volátiles que se condensan en los diferentes platos de la columna; normalmente cuando se emplean columnas en vez de alambiques el producto es más neutro, debido a que la destilación es más selectiva (23).



El rol de la destilación en la calidad del Tequila.

El rol de la destilación en la calidad del Tequila.

El rol de la rectificación del lote en la calidad del tequila, una bebida tradicional mexicana ha sido estudiado. Fue mostrado que la composición oficial estándar del tequila, particularmente en los cortes del destilado y el correcto balance del sabor componente, puede ser determinado por el monitoreo de variables como temperatura y tiempo así como de la concentración de los componentes regulados (etanol, metanol, alcoholes superiores, acetato de etilo, acetaldehídos y furfural) a través de los procesos de rectificación. Se encontró que esos componentes regulados son producidos en la misma escala de tiempo cuando son usados alambiques de acero inoxidable o de cobre. Cuando la destilación fue hecha en alambique de cobre sin embargo se encontró que el contenido de cobre del producto rectificado excede la cantidad permitida en la Norma Oficial. Finalmente se reporto una comparación de propiedades sensoriales de tequila destilado en alambiques de cobre y destilados en alambique de acero inoxidable (24).

Maduración: Transformación lenta del producto que le permite adquirir características sensoriales adicionales, obtenidas por procesos fisicoquímicos que en forma natural tiene lugar durante su permanencia en recipientes de madera de roble o encino (19).

Una vez destilado, el producto final se concentra en tinajas de paso en donde se diluye para pasarlo a los pipones o barricas donde se añejará dependiendo del tequila que se desee obtener. En la maduración de tequilas, la última etapa se realiza en barricas de roble o encino blanco, maderas que confieren al producto final aromas, colores y sabores muy peculiares, los cuales dependen de diversos factores como la edad, grosor de la duela, contenido alcohólico y condiciones de reposo o añejamiento. Son muy importantes las condiciones de humedad y ventilación, ya que en el proceso de envejecimiento se llevan a cabo reacciones de oxidación (25).



Aroma y Sabor.

El mosto tequilero obtenido durante esta etapa contiene compuestos como 5-Hidroximetilfurfural, 2-metil-2-furoato, furfural, 2(5H)furanona, 5-acetoximetil-2-furfural, 3,5-dihidroxi-3,5-dihidroxi-6-metil-4(H)piran-4-ona. La mayoría de estos compuestos se genera por la reacción de Maillard durante el cocimiento del agave. También se ha detectado la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, terpenos y vainilla que juegan un papel importante en el aroma del producto. Así mismo, el mosto contiene del 4 al 10 % de azúcares simples, principalmente fructosa y algo de glucosa (26).

La segunda etapa es la fermentación, ya sea espontánea o por adición de un inóculo de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. La velocidad de fermentación depende de la temperatura, composición del mosto y condiciones de operación, pero sobre todo de la cepa empleada. Esta etapa puede durar de 20 horas a tres días a una temperatura óptima de 35°C. Si la temperatura sobrepasa los 40 °C se detiene la fermentación por inactivación de la levadura. El pH inicial del mosto es de 4.5 y, a medida que avanza la fermentación, disminuye a valores cercanos a 3.9. La concentración de azúcares disminuye hasta un 0.4 %. En esta etapa pueden desarrollarse otros microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Esta es la etapa de mayor importancia, ya que los azúcares se transforman en etanol y otros compuestos que contribuyen al sabor y aroma característico del tequila. Los alcoholes superiores como el alcohol isoamílico, isobutanol, 1-propanol, fenetil y 1-butanol, junto con ésteres, aldehídos y metanol son los componentes volátiles de mayor concentración. Posteriormente en la destilación, el tequila define su carácter sensorial, ya que además de concentrar y separar el etanol, en esta etapa se modifican las concentraciones relativas de los volátiles menores que forman parte del mosto fermentado. Las cabezas contienen compuestos de bajo punto de ebullición como acetaldehído y alcoholes superiores, las colas tienen compuestos menos volátiles como el ácido acético, lactato y furfural, que por su sabor fuerte afectan de

manera negativa al tequila, al igual que algunos ácidos grasos y sus ésteres de ocho a 14 carbonos con aroma jabonoso (19). Por último el añejado o maduración en barricas de madera de roble o encino, se extraen algunos componentes de la madera como fenoles simples (eugenol), lactosas y taninos; productos derivados de la hidrólisis y tostado de la madera, como ácido acético y siringaldeído, pirazinas y pirroles entre otros. Asimismo, durante este período se forman algunos compuestos derivados de la interacción de polifenoles de la madera con los volátiles del destilado, así como la esterificación y pérdida o concentración de componentes del aroma (26).



Análisis de los compuestos que proporcionan Aroma y Sabor.

El estudio de los compuestos volátiles responsables del aroma resulta muy complejo, por varias razones:

- a) Se encuentran en concentraciones muy bajas, en ocasiones en partes por billón, por lo que el equipo analítico para estudiarlos tiene que ser muy sensible. A principios de la década de 1960 sólo se conocían unos cuantos cientos de compuestos, pero hoy en día se conocen más de 10,000 (26). Gracias al avance la ciencia y la tecnología, actualmente se cuenta con una gran cantidad de sistemas de extracción y técnicas instrumentales cada vez más sensibles y confiables, que permiten evaluar desde diferentes ángulos los compuestos del aroma y del sabor de los alimentos.
- b) La concentración de cada componente no siempre es un indicativo de su influencia en el aroma y sabor, ya que un solo compuesto, aún en baja concentración, puede provocar una fuerte estimulación sensorial. Por lo que se hace necesario analizar cada componente en relación con su concentración y al umbral de detección. Este último se define como la mínima cantidad de un compuesto que genera un olor o sabor detectable por un número específico de evaluadores.
- c) Los métodos usados para recuperar y concentrar estos compuestos pueden causar modificaciones cualitativas y cuantitativas. Incluso, durante el almacenamiento previo al análisis se inducen alteraciones; tal es el caso del 5-hidroxidecanoato de etilo y el 5-hidroxi octanoato de etilo que se encuentran en algunas frutas y que se convierten en sus respectivas lactonas, las cuales tienen un fuerte olor a coco (26). El análisis de los compuestos del aroma y sabor comprende varias etapas. En primer lugar, se realiza una extracción para separar estos compuestos del resto del producto; luego se concentran para incrementar la capacidad del análisis, se fraccionan y, por último, se identifican y cuantifican. Las técnicas analíticas comúnmente empleadas en la separación e identificación de los constituyentes del aroma incluyen a la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), la cromatografía de gases

acoplada a un detector de emisión atómica (GC-AED), la cromatografía de gases y olfatometría (GC-O); la espectroscopia de infrarrojo (IR), la resonancia magnética (RMN), el análisis de enantiómeros, etcétera (26).



Factores que influyen en la calidad del tequila.

La calidad final del tequila se construye partiendo de las materias primas y a lo largo del proceso. El primer paso es una selección y el control adecuado del agave tequilero, lo que permite garantizar que tenga la madurez adecuada para el proceso y proporcione componentes volátiles y precursores de aromas, además de azúcares fermentables, que permanezcan hasta el producto terminado.

Así mismo, temperaturas, presiones y tiempos de cocción adecuados de las cabezas de agave generan componentes volátiles que proveen aromas característicos que contribuyen en gran medida a la identidad del tequila sobre otras bebidas destiladas.

Las condiciones de obtención del jugo y la formulación del mosto también pueden contribuir al perfil del aroma, ya que los componentes volátiles deben extraerse y retenerse en el jugo. Si se adicionan otras fuentes de azúcar como el azúcar de caña o melazas, cambiará el perfil de volátiles en el mosto al compararlo con un tequila 100 % agave y se obtendrá un producto con diferentes propiedades sensoriales.

La fermentación provee muchos de los componentes volátiles que le dan carácter al tequila y, en general, a las bebidas alcohólicas.

La destilación es una operación clave para la construcción del perfil del aroma del tequila.

Finalmente el añejamiento proporciona otros componentes volátiles y no volátiles, provenientes de la madera y de las condiciones de oxidación dentro de los barriles, que contribuyen al aroma, al gusto y la textura del producto. El origen de la madera, su tratamiento previo, el grado de quemado y el empleo o no de barriles usados influirán en la calidad del producto.

El proceso completo determinará si el producto cumple con los parámetros regulados por la normatividad y los de composición volátil que le darán carácter sensorial al producto (27).

Los compuestos volátiles que contribuyen al olor y aroma del tequila.

- Los compuestos volátiles presentes en una bebida alcohólica obedecen a leyes fisicoquímicas de cualquier compuesto volátil en solución. El tequila es una mezcla de compuestos más o menos volátiles que se encuentran más o menos disueltos en una matriz etanol-agua. Según la polaridad de dichos compuestos habrá una afinidad mayor o menor por la matriz. La fracción de compuestos que migran hacia la fase gaseosa o atmósfera de una copa de tequila llagan a la nariz y viajan hacia el epitelio olfativo, donde, dependiendo de su naturaleza química, estimularán los distintos receptores olfativos y generarán el olor. La fracción de compuestos que permanecen interactuando con la matriz etanol-agua pasarán a la boca en el momento en el que el consumidor beba un trago de tequila. Al mezclarse el tequila con la saliva y la lengua lo manipule, el equilibrio vapor-líquido que caracterizaba al tequila en la copa se modificará, ya que además habrá un efecto de la temperatura de la boca (37°C). Según la afinidad de los compuestos en solución, así como de su punto de ebullición, una fracción de estos pasará a la fase de vapor dentro de la cavidad bucal y migrará hacia el epitelio olfativo a través de la vía retronasal para estimular a los distintos receptores olfativos, lo que da lugar al aroma. (27)
- Identidad del olor de algunos compuestos:

Compuesto	Olor
β damascenona	frutal
Acido Propanoico	vinagre-picante
Acetato de furfurilo	barniz de uñas
Trasgeraniol	rosa
Hexanoato de metilo	solvente-frutal
Dihidroxi-farnesol	violeta
Sotolona	caramelo-avellana

Tabla A. Identidad del olor de algunos compuestos presentes en el tequila. (27)

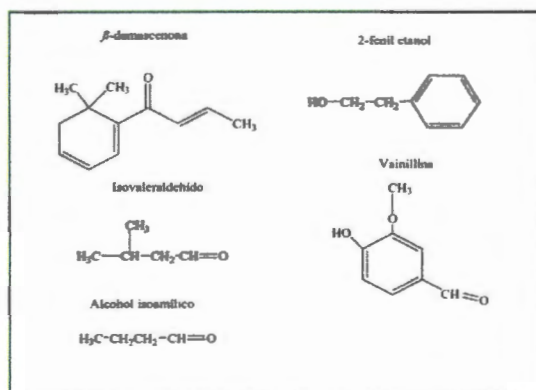


Figura 1. Compuestos responsables del sabor.

Los compuestos volátiles.

Estos compuestos son moléculas de bajo peso molecular, menor a los 400 daltones, pero que por lo general oscila entre 135 y 155 (28). Estos compuestos presentan una tensión de vapor elevada a la temperatura y presión atmosférica ambientales, lo que les permite pasar a la fase de vapor en la atmósfera gaseosa y provocar un estímulo en la mucosa olfativa (29). En publicaciones periódicas se reportan cerca de 5 mil compuestos responsables del aroma en los alimentos y bebidas. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas, entre ellas ésteres, alcoholes, cetonas, éteres, aminas, amidas, furanos, etcétera, y no aportan ninguna propiedad nutritiva a los alimentos y bebidas que lo contienen, pero son muy sensibles a la luz y el calor (29). Por otro lado, el aroma natural lo forman varios cientos de compuestos volátiles que desempeñan diferentes funciones al momento de producir la nota. Con base en lo anterior se puede mencionar diferentes tipos de aroma: cuando un compuesto por sí solo proporciona la nota típica del alimento, cuando varios compuestos pueden caracterizar al alimento, o bien cuando la mezcla de compuestos volátiles identificados representa sólo una fracción del aroma de producto (29).

Los compuestos aromáticos presentan un olor característico que se debe a su naturaleza química y estructura molecular. Entre las familias químicas, más importantes en este sentido destacan los hidrocarburos, los alcoholes, los aldehídos, las cetonas, los ésteres, las lactonas, etcétera.

Acetales: Estos compuestos se producen mediante reacciones químicas, entre acetaldéhdos y alcoholes. Tienen propiedades fragantes, algunas veces asociadas al aldehído del que se originan (30).

Ácidos: Este grupo de compuestos lo forman principalmente ácidos grasos y presentan notas que varían desde avinagrado hasta a queso, mantequilla, cabra, etcétera conforme aumenta el tamaño de la cadena (31).

Alcoholes: Este grupo se compone de diferentes tipos de compuestos, es posible encontrar alcoholes de cadena abierta o cerrada (alifáticos y aromáticos) que presentan o no insaturaciones dentro de la molécula. Estos elementos aportan una gran diversidad de notas olfativas, entre las más importantes se pueden mencionar la herbácea, frutal, cítrica, floral, etcétera (29).

Compuestos carbonilos: Esta familia la forman los aldehídos y las cetonas, compuestos muy importantes en el aroma de alimentos y bebidas. En general participan con numerosas notas aromáticas, como frutal, floral, cítrica, etcétera (29).

Compuestos de naturaleza química diversa: Estos compuestos tienen la característica de que son moléculas multifuncionales, es decir, que presentan en su estructura más de un grupo funcional, por ejemplo la vainillina (vainilla) y la fambrióna (frambuesa).

Ésteres y Lactonas: Los ésteres son los compuestos más abundantes en las diferentes bebidas alcohólicas, principalmente en el vino; los más numerosos son los acetatos y los etil ésteres de los ácidos grasos (31). Además aportan las notas frutales esencialmente y son muy característicos de un aroma en particular, por ejemplo el acetato de isoamilo (plátano), el acetato de linalino (bergamota) o el caproato de alilo (piña) (29).

Éteres: De este grupo sólo se conocen pocos compuestos; por ejemplo, el 1,8-cineol mayoritario en el eucalipto, y el anetol, que presenta la nota típica del anís.

Fenoles: Este grupo de compuestos lo forman alcoholes aromáticos que presentan diferentes propiedades. Además de su contribución al aroma, presentan actividades antioxidantes y bactericidas; los más conocidos dentro de las hierbas aromáticas son el timol y el carvacrol (29).

El eugenol (compuesto activo del clavo de olor) es otro compuesto fenólico de alto impacto aromático presente en las bebidas alcohólicas (29).

Metanol: La presencia de metanol en el tequila se atribuye principalmente a la hidrólisis de los grupos metoxilo del ácido galacturónico metoxilado, uno de los principales componentes de las pectinas del *Agave tequilana weber* (32).

Calidad sensorial del Tequila

En cuanto a los indicadores de calidad, cabe señalar que los primeros que utiliza el consumidor al primer trago de tequila son la apariencia, el olor y el sabor, ya que el control de calidad más riguroso por el que pasa una bebida es el que realiza el consumidor al probarlo. En cuestión de segundos, la persona analiza e identifica la apariencia, el sabor y otros atributos del producto con sus sentidos para decidir si lo acepta o no. El sabor es la puerta de entrada de una bebida hacia el consumidor (33).

Un alimento o bebida puede fracasar al llegar al consumidor, aún cumpliendo con parámetros fisicoquímicos, microbiológicos o nutricionales; si la combinación de ingredientes no tiene las proporciones adecuadas para generar una imagen sensorial agradable al paladar del consumidor el producto puede ser rechazado o adquirir una baja preferencia (34).

En el caso del tequila, la norma que actualmente regula en México su calidad (NOM-006-SCFI-2005) establece parámetros fisicoquímicos y metodologías encaminados a controlar, por un lado, el contenido de alcohol y, por otro, la presencia de compuestos volátiles que en cantidades elevadas o ingeridas de manera frecuente pueden ser tóxicos, lo que sucede en el caso del metanol y los alcoholes superiores (butanol, alcohol isoamílico, aldehídos y furfural). El alcohol es importante porque es el ingrediente mayoritario y contribuye de manera significativa en el precio y, por lo tanto, en el negocio del productor de tequila. Sin embargo, aún cuando tales compuestos se encuentren dentro de los límites definidos por la norma, esta información o estos parámetros no explican dos puntos determinantes para la aceptación, preferencia por el tequila y, en consecuencia, su compra:

- Apariencia, notas de olor, gusto, aroma, etcétera, que percibe el consumidor en función del tipo y proporción de compuestos volátiles y no volátiles que generan la imagen del sabor y la apariencia.
- Aceptación y/o preferencia del sabor del tequila, aunque en la vida diaria suele pensarse que estos dos factores son irrelevantes y que son aspectos simples y muy fáciles de medir sin mayor complicación ambos son fenómenos complejos, diferentes, aunque dependientes, que se llevan a cabo en niveles diferentes y generan información diferente.

El primer fenómeno es puramente fisiológico, pues lo genera la estimulación que producen los distintos estímulos físicos y químicos de los alimentos y bebidas sobre las células especializadas de los sentidos. El segundo es un fenómeno psicológico; se basa en la interpretación e integración cerebrales de las señales que emiten los sentidos en el fenómeno anterior. Estos dos tipos de información se complementan y generan imágenes sensoriales que nosotros traducimos y llamamos comúnmente: apariencia, olor, sabor y textura. Estas son las llamadas propiedades sensoriales u organolépticas y constituyen la calidad sensorial (34).

Métodos analíticos instrumentales.

Debido a la complejidad que presenta el aroma en muchos alimentos, y en particular en las bebidas alcohólicas, el análisis de los compuestos responsables de él presenta algunas dificultades. La primera dificultad es el hecho de que estos compuestos se encuentran sólo en pequeñas cantidades, en ocasiones incluso al nivel de trazas. En ocasiones a los compuestos los retiene fuertemente la matriz que los contiene, ya que éstas llegan a ser muy complejas (35).

Por otro lado, el perfil del aroma de un alimento o bebida lo constituye una gran cantidad de compuestos volátiles pertenecientes a una gran variedad de familias químicas (35).

Cromatografía

El primer paso para la identificación de diferentes compuestos consiste en separarlos de la matriz en que se encuentran.

La cromatografía se basa en la migración diferencial de los compuestos de una mezcla, bajo la influencia del desplazamiento de un fluido (fase móvil), sobre un medio poroso debido a las propiedades de adsorción, partición, afinidad, filtración o intercambio (fase estacionaria) (36).

En la cromatografía gaseosa una pequeña muestra del material se inyecta en la corriente de un gas inerte (gas acarreador inerte como nitrógeno o helio). Este gas pasa a una columna que contiene un medio apropiado para la separación pues retarda el flujo de los componentes de la muestra. Los compuestos separados emergen en diferentes intervalos, lo que depende de su tendencia a disolverse en la fase líquida estacionaria. Un coeficiente de distribución que favorezca el disolvente induce una baja velocidad. Por el contrario, aquellos componentes cuya solubilidad en la fase líquida es despreciable se desplazan rápidamente por la columna, pasan a través de un detector y se registran, obteniéndose así el cromatograma (37).

Los cromatografos constan de las siguientes partes (37):

- Gas portador o acarreador
- Cámara o sistema de inyección
- Columnas cromatográficas
- Sistema de detección
- Registrador
- La identificación y cuantificación

Evaluación Sensorial

La calidad de un producto depende de las necesidades y expectativas del consumidor. En el caso, de las bebidas alcohólicas se debe, por un lado, asegurar que el producto que se consume no contenga componentes tóxicos y que cumpla con las características especificadas en la etiqueta. La calidad sensorial del producto es, por lo tanto, un factor fundamental en el éxito de una bebida alcohólica, ya que, aparte de la estrategia de mercado para la imagen del producto (nacionalista, elitista, tradicional, divertido, etc.), una bebida alcohólica ofrece al consumidor básicamente sus atributos de color, aroma, gusto y textura, las cuales determinan aceptación y preferencia (28).

Las pruebas analíticas. Éstas utilizan solo la primera fase del análisis sensorial, es decir, la fase en la que se identifica y cuantifica un estímulo, sin considerar la componente afectiva.

Las pruebas hedónicas. El objeto de estas pruebas es medir la componente afectiva, es decir, el nivel de agrado o preferencia de un producto determinado en función de las características percibidas mediante los sentidos.

Pruebas Discriminativas (que permiten diferenciar dos muestras en función de algunas características sensoriales más evidentes)

- **Prueba triangular:** permite diferenciar entre dos muestras A y B. Se presentan al juez 3 muestras donde alguna de las dos A o B se repiten, por ejemplo ABB, BBA o cualquiera de las seis combinaciones posibles. En este caso la pregunta es cuál de las muestras es diferente, en esta prueba el nivel de azar es de 33 % y la prueba es la más usada para comparar o identificar diferencias entre dos muestras cuando no se conoce absolutamente nada de las muestras o se cuenta con pocos jueces o estos son poco entrenados (38).
- **Prueba de pares,** al igual que la prueba anterior, permite discriminar entre A y B. Se presenta al juez dos pares de muestras AB y BA y se le pregunta si son diferentes sobre la característica de interés. En este caso el nivel de azar es de 50 % por lo que, debe utilizarse cuando se conoce la característica que interesa o sobre la cual se van a comparar las dos muestras, los jueces deben ser lo suficientemente entrenados y numerosos para que se generen resultados confiables (39).
- **Prueba dúo-trío,** en esta prueba al igual que en las anteriores, se compara A y B, sin embargo, en este caso es importante que, una de las muestras sea bien conocida en la mayoría de sus características. En esta prueba, el juez recibe tres muestras, dos muestras de A y una de B, pero, a diferencia de la prueba triangular, en este caso para la muestra que se repite, una de ellas es presentada marcada como R y la otra es codificada al igual que B, y la tarea que se le pide al juez es de memorizar perfectamente R y después buscar entre las otras dos muestras codificadas, cuál de ellas es semejante a la R. El nivel de azar en este caso es también de 50 % y el uso más aconsejable es para pruebas de control de calidad, ya que, en estas pruebas, se está comparando constantemente con R, que es la muestra que representa al estándar. Se requiere se jueces suficientemente entrenados que, además, conozcan muy bien las características de la muestra R (40).
- **Prueba A No-A:** En este caso se pueden comparar entre 3 y hasta 5 diferentes muestras, es muy semejante a la prueba dúo-trío, ya que, una de las muestras, a comparar se repite y se tomará como referencia, por lo que se marcará como A. Entonces el juez recibe una muestra referenciada marcada como A y otras 3, 4 o 5 (A, B, C, D, E) muestras anónimas, codificadas con códigos numéricos. Se le pide al juez que memorice muy bien la o las características de la muestra marcada como A y posteriormente que analice las muestras problema, tratando de identificar cuál o cuáles son semejantes a A (41).

Particularidades en el entrenamiento de los jueces analíticos de tequila.

Durante el entrenamiento de los jueces analíticos para la medición del sabor del tequila, como para todos los productos del mismo tipo, es necesario:

- Familiarizarlos con el universo de estímulos (tipo y concentración)
- Entrenarlos en la identificación y cuantificación de los distintos estímulos mejorando su exactitud y repetibilidad.
- Entrenar al juez, lo que equivale a las curvas de calibración que se construyen cuando se calibra cualquier instrumento de medición. Esto permite contar con un instrumento cuya sensibilidad, resolución, repetitividad y reproducibilidad has sido caracterizados (42).

Existe información sobre compuestos odorativos, esta información se genero a partir de un análisis cromatográfico y olfato métrico realizado en 1996 por Benn y Pepard (8).

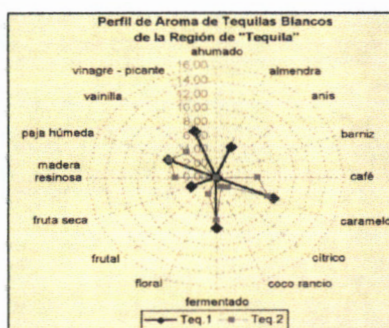


Figura 2. Perfil de olor de tequila blanco.

Un camino que puede tomar la investigación sobre la calidad sensorial del tequila es la identificación certera de los compuestos clave con impacto en el aroma y gusto del producto. Esto requiere estudios más profundos sobre la correlación entre la composición volátil y la evaluación sensorial. Las técnicas olfatométricas, las herramientas estadísticas multivariantes y otro tipo de modelado matemático, como las redes neuronales, se encaminan a conocer más a fondo al respecto. La información que generan estas herramientas se puede aplicar al desarrollo de los equipos llamados nariz electrónica, que permitirán hasta cierto límite, estimar las propiedades aromáticas de un producto (42).

Justificación:

Actualmente no existe una técnica fisicoquímica que permita diferenciar en los destilados de agave, si se elaboraron por medio de una mezcla en frío.

Hipótesis

Si se fermenta mosto de agave y caña juntos y posteriormente son destilados, al realizarle un análisis de cromatografía de gases, se encontrarán diferencias al compararlo con un producto obtenido de la mezcla en frío del destilado de agave y destilado de caña.

Objetivo General:

Estudiar las diferencias en la composición de los compuestos volátiles de cuatro bebidas obtenidas de:

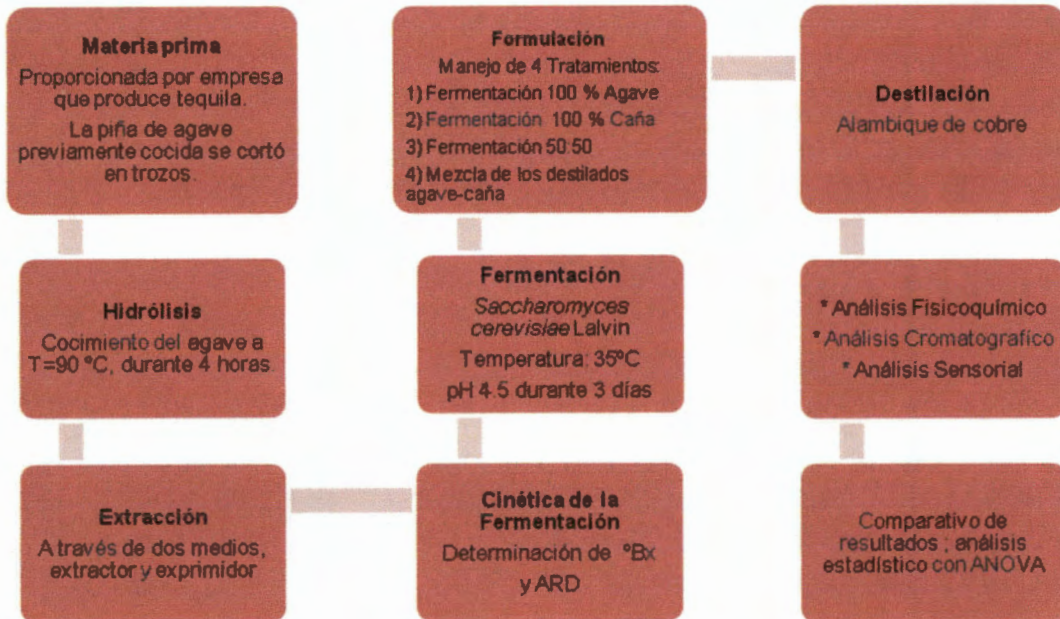
- 1) Destilado de agave 100 % (*azul tequilana weber*)
- 2) Destilado de caña 100 % (*Saccharum officinarum*)
- 3) Mezcla del destilado de agave y del destilado de caña
- 4) Destilado procedente de la fermentación de agave y caña juntos (50:50)

Objetivos Particulares:

- Efectuar el proceso de fermentación de la mezcla agave y jugo de caña a nivel laboratorio.
- Establecer la metodología de análisis cromatográfico necesaria para poder identificar los principales constituyentes químicos
- Compilar las técnicas y adaptarlas para la determinación del contenido de alcohol, extracto seco, alcoholes superiores, metanol, aldehídos, esteres y furfural.
- Establecer un cuadro comparativo de los parámetros fisicoquímicos analizados donde se reflejen las diferencias entre los cuatro productos, para corroborar la hipótesis planteada.
- Efectuar con jueces semi-entrenados las posibles diferencias sensoriales entre los cuatro productos estudiados.

Metodología

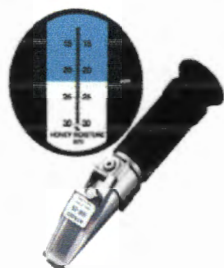
Diagrama de Flujo



Desglose de los análisis a realizar:

Análisis Físicoquímicos:

° **Bx**, la medición de los grados se efectuara con un refractómetro de mano Atago modelo Master-M, con un intervalo de medición entre 0 - 35% de °Bx y entre 1.330 y 1.3900 de índice de refracción.



pH

El pH se midió con un potenciómetro Corning modelo 475645



Azúcares (ARD)

Método de Fehling (Modificación de Cause Bonnans) (43).

El método se basa en que la temperatura de ebullición y en medio alcalino, los azúcares que poseen función carbonilo libre, reducen el Cu^{2+} . La modificación de Cause Bonnans, utiliza el ferrocianuro de potasio en el reactivo, para evitar la precipitación del Cu_2O que se forma durante la titulación.

A. Determinación del factor de Fehling

1.- Colocar en un matraz Erlenmeyer de 250mL, 10 mL del reactivo de Fehling exactamente medidos. Agregar 30 mL de agua destilada, y 3 perlas de ebullición agitar con cuidado para homogenizar.

2.- Calentar el matraz sobre una tela de asbesto y con llama suave.

3.- Cuando el reactivo de Fehling comience a hervir, agregar desde una bureta la solución de azúcar invertida o la glucosa, a razón de dos o tres gotas por segundo, cuidando que la ebullición no se interrumpa durante la titulación.

4.- Cuando se acerca el punto final de la titulación, el líquido toma una coloración amarillo canario.

Preparación y titulación del reactivo de Fehling:

Los constituyentes son:

Tartrato de sodio y potasio	130 g
NaOH	110 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	24 g
K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	16.8 g

Aforar a 1L con agua destilada.

Titulación del reactivo de Fehling:

A) Solución de glucosa al 0.5%

Se pesan 0.5g de glucosa pura y desecada en estufa a 70°C durante 5 minutos, se disuelve en agua destilada y se completa el volumen a 100mL.

Cálculos:

$$\% \text{ glucosa} = \frac{(V_a) \times (F)}{(V_{ali}) \times (v)} \times 100 \times F_{dil}$$

Donde:

V_a = volumen de aforo del mosto

F = Factor de Fehling

F_{dil} = factor de dilución.

V_{ali} = volumen de mosto tomado

v = volumen gastado en la titulación

$$F_{dil} = \frac{\text{Volumen final de la alícuota tomada}}{\text{Volumen}}$$

Titulación de la muestra problema

El mosto con o sin fermentar deberán estar libres de toda sustancia que no sean carbohidratos, por lo que es necesario defecar la muestra.

Defecación de la muestra: Se coloca una alícuota de mosto, que dependerá de la cantidad de carbohidratos esperada. Mostos dulces de 5 a 10 mL, mostos fermentados 30 mL. Se adicionan 10 mL de solución al 10% (p/v) de subacetato de plomo (II). Se agita el matraz y se deja precipitar el sistema, se afora con agua destilada y se deja sedimentar 5 minutos, posteriormente se filtra.

El filtrado se coloca en la bureta y se titula de manera similar a la valoración del reactivo de Fehling.

Contenido de alcohol en %

1. En un matraz de destilación de 100 mL, agregar 25 mL de mosto destilado con pipeta volumétrica, añada 10 mL de agua destilada. Adicione 3 perlas de vidrio para controlar la ebullición.
2. La destilación debe hacerse con flama constante, recoger en una probeta de 100 mL y aforar con agua destilada.
3. Determinar el grado alcohólico por densimetría.

Los análisis fisicoquímicos se realizarán tomando en cuenta las siguientes normas:

- 1) Determinación del pH en alimentos NMX-F-317-S-1978.
- 2) Determinación de azúcares reductores directos y totales-Métodos de ensayo prueba NMX-V-006-NORMEX-2005. Los monosacáridos poseen un poder reductor, que deben al grupo carbonilo libre que tienen en su molécula. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre una solución de sulfato de cobre (ión cúprico) y una solución amortiguadora de tartrato de sodio y potasio que se calientan en presencia de un azúcar reductor. Las soluciones de esta sal tienen color azul. La reacción con el azúcar, forma óxido de cobre (ión cuproso) de color rojo. De este modo el cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el azúcar presente es reductor.
- 3) Método de prueba para la determinación del contenido de alcohol en bebidas alcohólicas. NMX-V-013-NORMEX-1996. Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de Por ciento alcohol en volumen a 293 K (20°C) (% Alc. Vol).

Esta determinación está basada en la medición del contenido alcohólico a una temperatura estable en una mezcla hidroalcohólica, a través de un alcoholímetro certificado y de un termómetro calibrado. El contenido alcohólico es la cantidad de alcohol etílico en 100 volúmenes de una mezcla alcohólica.

- 4) Determinación de Grados Brix, Alimentos, frutas y derivados NMX-F-103-1982.
- 5) Método de prueba para la determinación de extracto seco en bebidas alcohólicas. NMX-V-017-NORMEX-2005. El extracto seco está definido como los compuestos no volátiles, sin embargo las condiciones físicas para la definición de no volátiles se debe precisar como los compuestos utilizados en las formulaciones de las bebidas alcohólicas ya que pueden ser un indicador de adulteración de las mismas.

Análisis cromatográficos:

La composición volátil fue analizada por una inyección directa de 0.4 µL de las muestras destiladas en un equipo de Cromatografía de gases HP6890 con un detector de ionización de flama. Una columna (30 m x 0.250 mm x 0.25 mm), para la separación de compuestos volátiles es usado como gas acarreador Helio con un flujo de 1.5 mL/min. La temperatura del horno está programada a una temperatura inicial de 60 a 200 °C a una velocidad de 6 °C/min, 10 min. Modo Split 1:50. El inyector y el detector se encuentran a una temperatura de 200 °C.

Compuestos analizados

- Alcoholes superiores
- Aldehídos
- Ésteres
- Etanol
- Furfural
- Metanol

6) Método de prueba para la Determinación de **aldehídos, ésteres, metanol, y alcoholes superiores por Cromatografía de Gases**. NMX-V-005-NORMEX-2005. Bebidas alcohólicas-Determinación de aldehídos, ésteres, metanol, y alcoholes superiores.

Este método se basa en la cromatografía de gases y consiste en la inyección de una pequeña cantidad de la muestra (que contiene una mezcla de sustancias volátiles) en el inyector de un cromatógrafo de gases en el que son vaporizadas y transportadas por un gas inerte a través de una columna empacada o capilar con un líquido de partición que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra, ocasionando su separación.

Los componentes que eluyen de la columna pasan por el detector, el cual genera una señal eléctrica proporcional a su concentración, la que es transformada en un cromatograma.

La identificación de cada componente registrado como un pico en el cromatograma, se realiza por inyección de los componentes en forma pura y con concentraciones parecidas a la muestra de estudio, midiendo el tiempo de retención bajo esas condiciones.

También se puede comprobar por adición del componente a la muestra e inyectándola nuevamente para apreciar el incremento de altura o área del pico correspondiente.

La cuantificación se puede efectuar por cualquiera de estos tres métodos: normalización, estandarización externa y estandarización interna, siendo este último el que se describe a continuación:

La cuantificación por estándar interno consiste en obtener el cromatograma de la muestra adicionada de un estándar interno. Se selecciono el aldehído octílico (Sigma-Aldrich, USA), debido a que no forma parte de los componentes del tequila, además de presenta una buena resolución cromatográfica.

Análisis Sensorial

1) Selección de Jueces

Durante el entrenamiento de los jueces analíticos para la medición del sabor del tequila, es necesario:

- Familiarizarse con el universo de estímulos (tipos y concentraciones)
- Entrenarlos en la identificación y cuantificación de distintos estímulos mejorando su exactitud y repetitividad.
- Entrenar al juez, equivale a las curvas de calibración que se construyen cuando se calibra cualquier instrumento de medición.

2) Pruebas de sensibilidad

Criterio Pre-selección

Prueba de Identificación

Prueba de Asociación

Realizar la **Prueba A No-A**: En este caso se pueden comparar entre 3 y hasta 5 diferentes muestras, es muy semejante a la prueba dúo-trío, ya que, una de las muestras, a comparar se repite y se tomará como referencia, por lo que se marcará como A. Entonces el juez recibe una muestra referenciada marcada como A y otras 3, 4 o 5 (A, B, C, D, E) muestras anónimas, codificadas con códigos numéricos. Se le pide al juez que memorice muy bien la o las características de la muestra marcada como A y posteriormente que analice las muestras problema, tratando de identificar cuál o cuáles son semejantes a A.

Resultados y discusión

- Tratamiento I (Fermentación de 100 % Agave)
- Tratamiento II (Fermentación de Mezcla Agave-Caña 50:50)
- Tratamiento III (Fermentación de 100 % Caña)

En el Tratamiento I se utilizó una piña de agave cocida con un peso de 18.285 kg, la cual se cortó en pedazos y se congeló para uso posterior.

En el caso del Tratamiento II Se utilizó una piña con un peso de 10.385 kg, se encontraba congelada y sin cocer la cual se cortó en pedazos, la materia prima se sometió a un proceso de cocción a vapor durante 8 horas, se revisó y la materia prima aún no estaba cocida. Por lo que se efectuó la cocción en olla de presión a temperatura de 125°C, durante 4 h en dos etapas y se realizó la mezcla con jugo de caña en una proporción 50:50.

En el Tratamiento III se utilizó Jugo de caña (Grados Brix 19) proveniente de Guadalajara, el jugo se mantuvo en congelación hasta su uso.

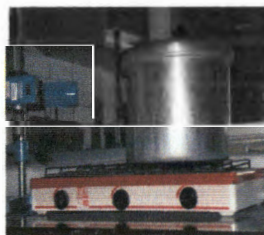


Figura 1. Cocción del agave

Cocción con 6 kg de piña, cada lote se cosió en olla de presión, con 4 L H₂O, durante 4 h.

Preparación del mosto, para extracción del jugo de agave, se ensayaron dos métodos:



Figura 2 a. Extracción manual.



Figura 2b. Extracción con extractor de jugos Túrmix

El método b, fue el más eficiente. El jugo obtenido presentó un color café oscuro, con características a la cocción de dulce de calabaza.

El método seleccionado para la extracción del jugo fue usando un extractor Túrmix.



Figura 3. Extracción del jugo



Figura 4. Agave cocido

Preparación del inculo: Se pesaron 5 g levadura *Saccharomyces cerevisiae* (LALVIN), se agregaron en un matraz Erlenmeyer con 25 g azúcar estándar la cual se disolvió en 50 mL de agua destilada, se mantuvo en un agitador orbital (ESM-S.A., México) a 100 rpm adicionándole mosto azucarado hasta obtener un 5 % v/v.



Figura 5. Fermentador capacidad 5 L.

El inculo se adicionó al fermentador, para cada tratamiento, se manejaron 3 fermentadores con 5 L cada uno de los jugos respectivamente (Jugo de Agave, Jugo de Agave-Caña y Jugo de Caña).

La fermentación se llevo a cabo a temperatura controlada a 35 °C, durante 3 días para cada lote.



Figura 6. Fermentación

Una vez que el mosto estuvo formulado con la cantidad deseada de azúcares y la levadura se pudo iniciar la Fermentación.

Es importante mencionar que la velocidad de fermentación dependerá de diferentes factores, como la composición del mosto, las condiciones de operación, pero sobre todo de la cepa de levadura utilizada.

Esta es la etapa de mayor importancia, ya que los azúcares se transforman en etanol y otros compuestos que contribuyen al sabor y aroma característico del tequila (27).

El pH inicial del mosto fue de 4.5 y, a medida que avanzaba la fermentación, disminuyó a valores cercanos a 3.9.

Terminada la etapa de fermentación, se dejó el mosto en refrigeración de 4°C para continuar con la destilación.

Las pruebas realizadas a los mostos fueron: pH, Grados Brix (°Bx), Azúcares Reductores Directos y a continuación se presenta la Tabla 1 con los resultados obtenidos.



Figura 7. Reactivo de Fehling

Análisis	Tratamiento I 100 % Agave		Tratamiento II Agave-Caña		Tratamiento III 100 % Caña	
	Mosto	Mosto Fermentado	Mosto	Mosto Fermentado	Mosto	Mosto Fermentado
°Bx	22	5	19.2	2	19	2
pH	4.5	3.9	4.3	3.9	4.3	3.9
ARD (g/100mL)	18.6	0.15	10.7	1.23	11.7	0.42
Consumo Azúcares	99.3 %		93.52 %		96.37 %	

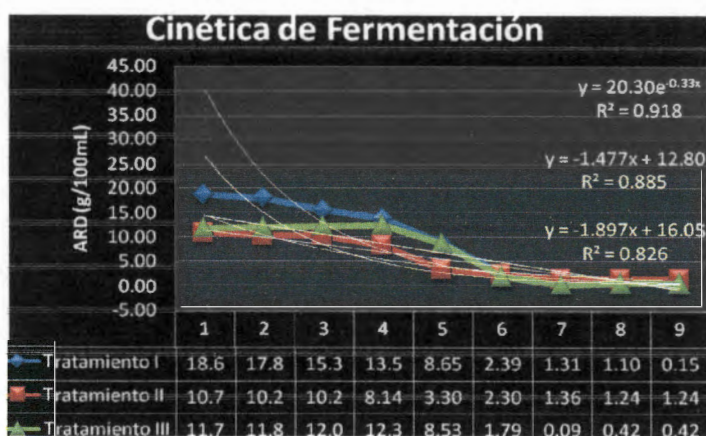
Tabla 1. Resultados de los análisis fisicoquímicos.

La concentración de los tres mostos fue diferente, debido a su origen, el mosto de 100% de agave resulto ser el más dulce, los tres mostos no requirieron ser enriquecidos con ningún suplemento (vitaminas o sales) para efectuar la fermentación alcohólica.

La grafica 1 muestra el comportamiento del consumo de azúcares conforme pasa el tiempo para cada uno de los tratamientos, donde se observó que hay un consumo más alto de azúcar en el jugo de agave obteniendo el rendimiento de 99.3%

El comportamiento de la cinética presentó una clara diferencia en el consumo de azúcar pudiéndose deber al tipo de cepa empleada, presentando modelos matemáticos del tipo exponencial y lineal.

En la fermentación el pH, la temperatura, el porcentaje de oxígeno disuelto, etc., tienen una influencia directa sobre el meta bolito que se está produciendo.



Gráfica 1. Comportamiento de la fermentación de los tres tratamientos

Tratamiento	Grados Brix (°Bx)	Velocidad específica máxima de consumo de azúcares (g/g.h)
I (100 % agave)	22	6.69
II (50:50 agave-caña)	19.2	2.96
III (100 % caña)	19	4.62

Tabla 2. Velocidad específica máxima de consumo de azúcares.

Lo que se puede observar es que el Tratamiento I presenta una mayor velocidad específica de consumo de azúcares, esto puede deberse a que la Levadura consume o prefiere el consumo de Fructosa al de glucosa.

La bebida destilada obtiene sus aromas característicos debido a los siguientes factores:

- Tipo y calidad de la materia prima
- Condiciones de operación en las diferentes etapas
- Cantidad de constituyentes congéneres del etanol que se producen durante la elaboración.

Análisis	Tratamiento I	Tratamiento II	Tratamiento III
Alcohol volumen	18.0 %	13.0 %	30 %

Tabla 3. Resultados de la Primera destilación



Figura 8. Alambique de cobre

El objetivo de la destilación fue separar y obtener los compuestos más volátiles de la mezcla líquida, se utilizó el método de la rectificación o enriquecimiento.



Figura 9. Sistema de destilación con recirculado de agua

Al realizar la destilación siempre se involucran los siguientes factores (Stichlmair y Fair, 1998) (44).

- a) Creación de un sistema de dos fases
- b) Transferencia de masas entre las dos fases
- c) Separación de las fases



Figura 10. Destilación (Rectificación)



Figura 11. Recuperación del destilado

Análisis	Tratamiento I	Tratamiento II	Tratamiento III	Especificación NOM-006-SCFI-2005
Alcohol volumen	38.2 %	35 %	35 %	35-55 %

Tabla 4. Resultados de la segunda destilación

Diferentes estudios se han realizado para caracterizar la composición volátil del Tequila (Larios 1996; Benn y Peppard 1996). Dentro de los compuestos volátiles que se han encontrado en Tequilas blancos 100 % agave son:

- Ácidos
- Alcoholes
- Carbonilos
- Ésteres
- Fenoles
- Furanos
- Terpenos

Los destilados se analizaron por cromatografía de gases CG-FID y sensorialmente por pruebas discriminativas ("A" "no-A"), a continuación se presentan los resultados cromatográficos:

El análisis de la fracción destilada del Tratamiento I (100 % Agave) por cromatografía de gases detectó abundantes componentes diferentes al etanol, se pueden observar alrededor de 31 picos que son compuestos como el; acetaldehído, acetato de etilo, metanol, propanol, alcohol isobutílico, alcohol isoamílico, lactato de etilo, ácido acético y furfural.

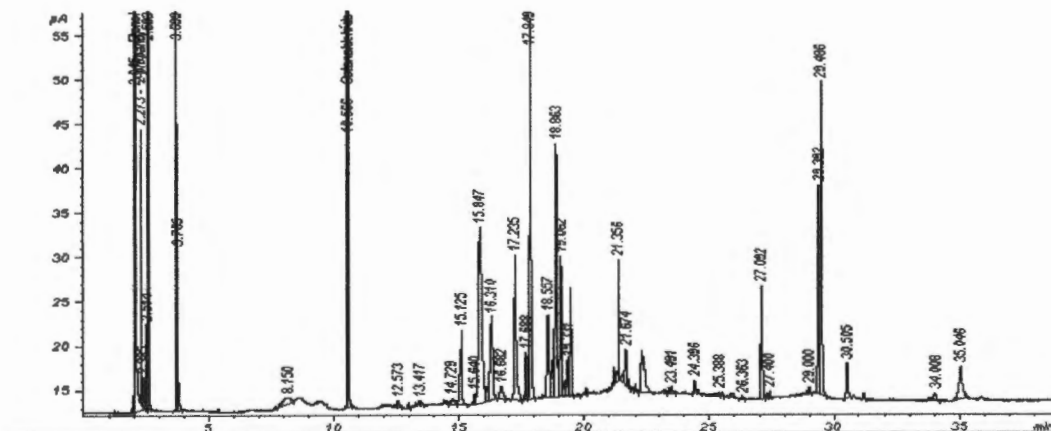


Figura 1A. Cromatograma del Destilado 100 % Agave

El análisis del Tratamiento II (Mezcla Agave-Caña) por cromatografía de gases dio un número de picos menor al tratamiento anterior, 18 picos, siendo los compuestos comunes el metanol, etanol y propanol.

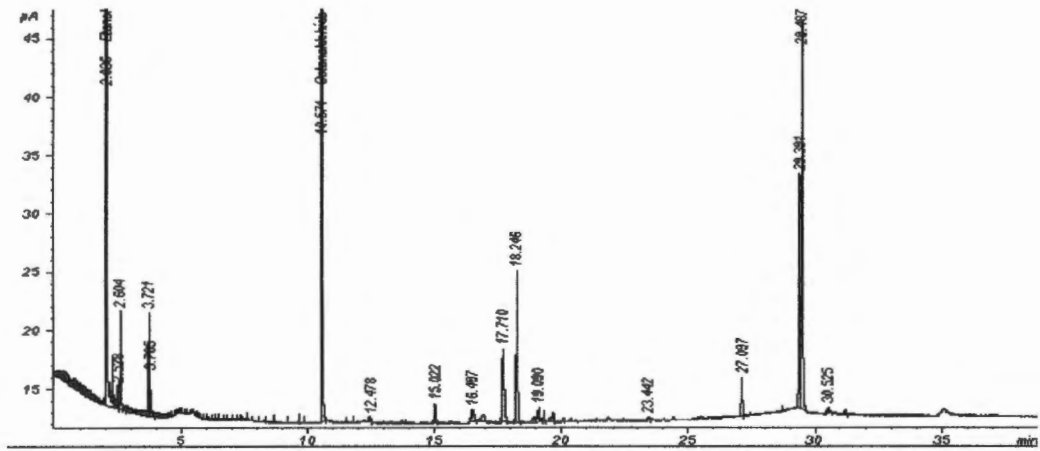


Figura 2B. Cromatograma del Destilado Agave-Caña (50:50)

El análisis del Tratamiento III (100 %Caña) por cromatografía de gases presentó un número de picos menor a los dos tratamientos anteriores de 16 picos.

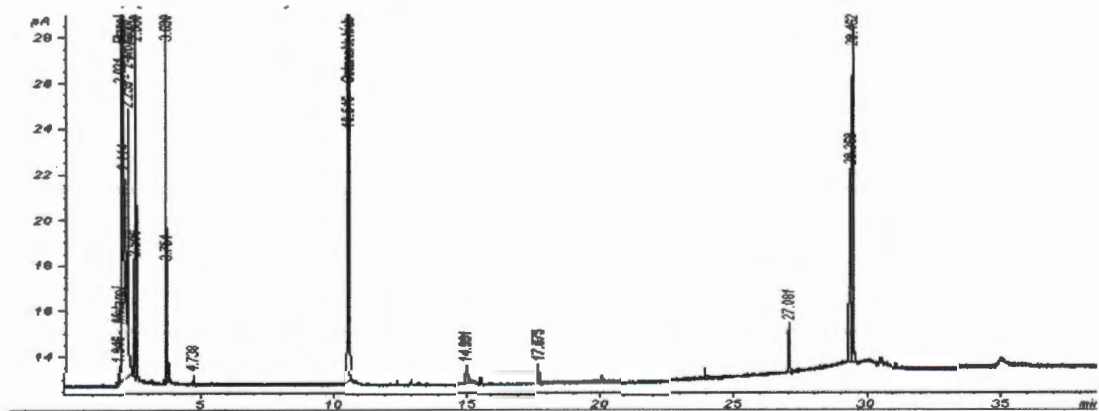


Figura 3B. Cromatograma del Destilado 100 % Caña

El análisis del Tratamiento IV (Mezcla en frío) por cromatografía de gases presentó un número de picos menor a los tratamientos anteriores de 12 picos.

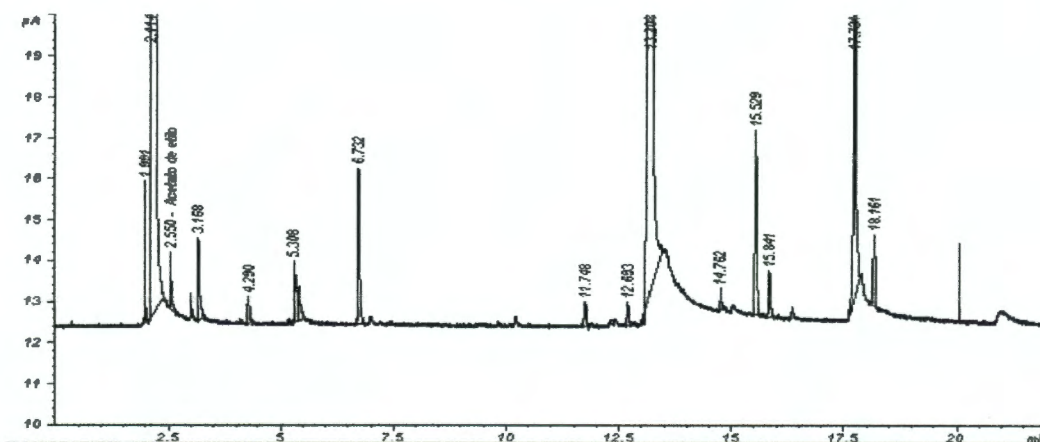


Figura 4B. Cromatograma de la Mezcla en frío.

Se observa que el cromatograma de la Mezcla en frío presenta dos picos con tiempos de retención de **15.529** y **17.731** que no se encuentran en el cromatograma del destilado 100 % Agave pero si se comparten en el cromatograma del destilado agave-caña con el tiempo de **17.606** y también en el destilado de caña con el tiempo de **15.585** pudiendo ser el compuesto Fenetil alcohol.

En la tabla 4 se reportan los compuestos volátiles en mg/100 mL de alcohol anhidro producido por la cepa *S. cerevisiae*.

Compuestos Volátiles detectados en los Destilados	Tratamiento I 100 % Agave	Tratamiento II Mezcla 50:50	Tratamiento III 100 % Caña	Tratamiento IV Mezcla frío
Acetato de etilo $\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$	1.006 mg/L	5.037 mg/L	18.464 mg/L	0.274 mg/L
Metanol CH_3OH	1.023 mg/L	3.337 mg/L	NP	0.578 mg/L
Etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	3182.10 mg/L	2706.05 mg/L	21583.61 mg/L	1141.17 mg/L
Propanol $\text{CH}_2(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	5.162 mg/L	5.037 mg/L	23.463 mg/L	0.426 mg/L
Lactato de etilo $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$	3.144 mg/L	7.439 mg/L	NP	0486 mg/L
Acido acético $\text{CH}_3\text{-COOH}$	0.844 mg/L	3.527 mg/L	NP	0.237mg/L
Furfural $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$	NP	NP	NP	0.836 mg/L

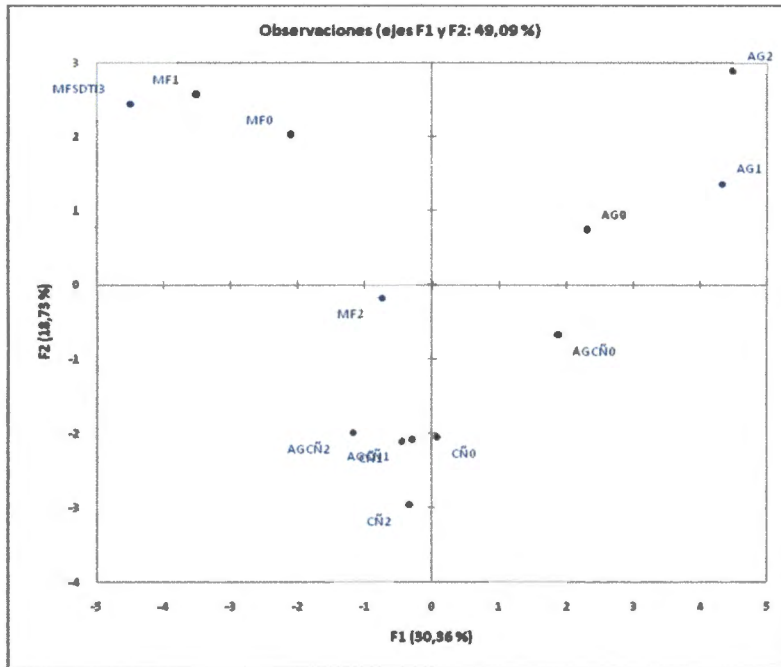
Tabla 4. Compuestos encontrados en los diferentes tratamientos.

NP = No presente.

A través del análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa estadístico XLSTAT 2012.1.01, se analizó la variabilidad entre los compuestos volátiles debidas a las condiciones de fermentación estudiadas para los destilados de agave obtenidos. Los destilados fueron claramente distinguidos el uno del otro. La gran variabilidad observada entre los destilados es debida a factores tales como: el tipo de levadura empleada, las condiciones de fermentación, la composición del mosto y el sistema de destilación empleado que marcadamente afecta la composición final de compuestos volátiles en las bebidas alcohólicas. (Oliveira et al. 2005; Romano et al. 2003; Díaz-Montaño et al. 2008).

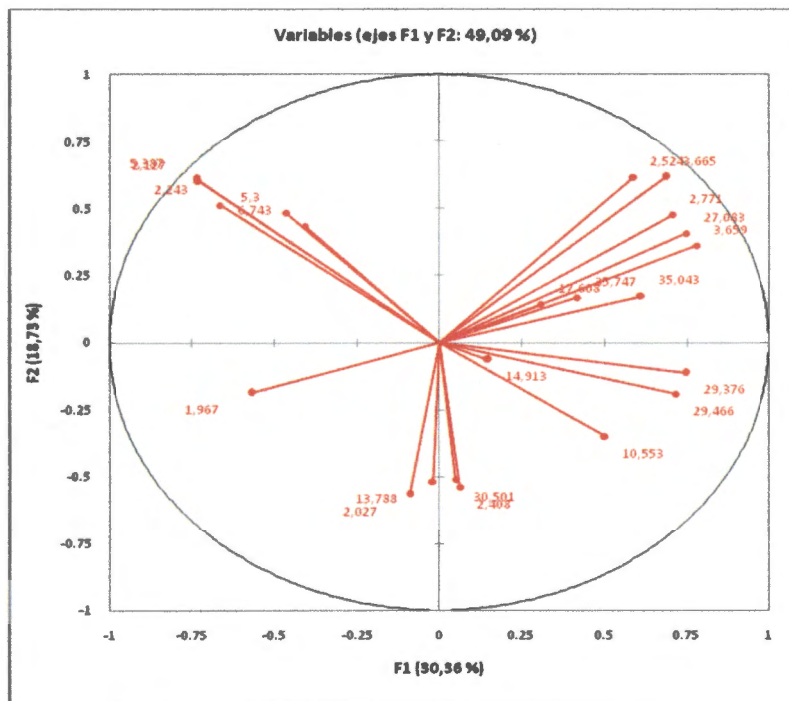
Coordenadas de las observaciones:

Observación	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
AGCÑ0	1.89462	-0.67441	-0.85587	0.542894	1.304181	-0.7482	-1.41247	-1.99536	0.0424	0.58585	-0.08506	0.06731
AGCÑ1	-0.2916	-2.08013	4.232813	0.370658	0.003794	-0.0295	-0.07615	-0.24932	0.965999	-0.66523	-0.59432	-0.08461
AGCÑ2	-1.1731	-1.98411	2.269973	0.503561	0.257204	0.87077	-0.60207	0.763457	-0.46624	0.92093	0.86113	0.31879
CÑ0	0.07654	-2.0457	-1.26306	0.203537	0.795608	0.82213	2.357425	-0.42945	0.559841	0.51307	0.3381	-0.33075
CÑ2	-0.3389	-2.96365	-2.78573	-0.51585	1.661281	0.3622	0.014813	0.409618	0.152787	-0.07923	-0.74386	0.485748
CÑ1	-0.4607	-2.10827	-1.20398	0.326013	1.483483	-0.1633	-1.36688	0.350158	-0.55936	-0.51449	0.3829	-0.61599
AG0	2.308	0.736345	-0.38706	0.435569	1.077421	-2.8297	0.052716	1.37534	0.535101	0.40734	-0.03363	-0.03717
AG1	4.32503	1.368659	-0.87601	1.102003	2.011536	1.88142	-0.37865	0.581141	0.164309	-0.90512	0.14447	0.082619
AG2	4.48511	2.889553	1.175216	1.766891	2.76215	0.53645	0.412838	-0.32122	-0.34017	0.42199	-0.01684	-0.00749
MF0	-2.0992	2.022326	0.231644	3.690713	0.592602	0.29616	0.181416	0.291001	-0.33973	0.52359	-0.77422	-0.20693
MF1	-3.4983	2.564781	-0.72937	0.763858	1.410073	-0.5462	-0.0053	-0.45881	1.08718	-0.55601	0.83039	0.206544
MF2	-0.7445	-0.17107	0.620768	0.093282	0.697869	-1.3144	1.298846	-0.46113	-1.60574	-0.86047	0.08529	0.193868
MFSDTI 3	-4.483	2.445671	-0.42935	3.077793	1.769564	0.86214	-0.47652	0.144582	-0.19637	0.20778	-0.39435	-0.07194



Grafica 1. Componentes principales.

Los resultados de la Grafica 1 que a continuación se presentan permiten visualizar que las muestras evaluadas se separan bien en cada uno de los cuadrantes.



Grafica 2. Asociación de las variables.

La Grafica 2 permite visualizar el grado de asociación de las variables (con base en sus tiempos de retención) y aquellos que separan mejor los grupos (tratamientos). Todos los compuestos del lado derecho se asocian a las muestras con agave y del izquierdo a los que solo tuvieron caña y agave. Los compuestos en el cuadrante superior derecho fueron distintivos del destilado 100% agave, mientras que los del inferior

derecho fueron distintivos de las muestras agave-caña. Finalmente los compuestos en el cuadrante superior izquierdo muestran los que pertenecen a la Mezcla en Frío.

Evaluación Sensorial:

Los destilados obtenidos fueron sometidos a diferentes evaluaciones sensoriales. La prueba discriminativa "A" "No-A" fue implementada a los destilados, con la finalidad de confirmar las diferencias de la prueba a consumidores y definir sus características sensoriales.

Durante la primera prueba realizada se les presentó a los jueces muestras comerciales, las cuales se codificaron como A (muestra referencia) y cuatro muestras más codificadas con números aleatorios para la selección de los jueces, donde participaron 23 jueces y se seleccionaron 18 de los cuales el 39 % contestó correctamente, es decir, los jueces encuentran diferencias entre los cuatro productos, el 39 % contestó muy cercano a la respuesta y el 22 % no encuentra diferencias por lo que estos son descartados.

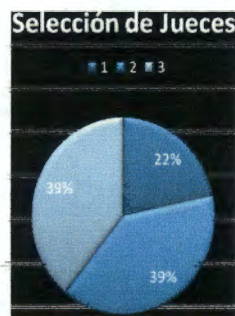


Figura 12. Selección de jueces.



Figura 13. Participación de jueces

Se realizaron dos repeticiones de la parte sensorial con la participación de 14 jueces a los cuales se les presentaron las muestras elaboradas.

Para la segunda prueba realizada se presentó a los jueces nuevamente las mismas muestras comerciales para obtener una lista de descriptores.

Lista de Descriptores				
Olor encontrado		Olor reportado en literatura		
Agave	Floral	Ahumado	Coco rancio	Vainilla
Anís	Frutos secos	Almendra	Fermentado	Vinagre-picante
Chocolate	Herbal	Anís	Frutal	
Cítricos	Hojas húmedas	Bamiz	Fruta seca	
Dulce	Madera	Café	Floral	
Especias	Vainilla	Caramelo	Madera resinosa	
Vinagre-picante		Cítrico	Paja húmeda	

Tabla 5. Lista de descriptores.

Tabla comparativa con la lista de descriptores para cada tratamiento que los jueces encontraron, se calculo la χ^2 obteniendo una significancia de 6.10 y un valor $P= 0.013$ que indica la confiabilidad de la prueba.

Lista de Descriptores						
Tratamiento I Agave 100 %		Tratamiento II Agave-Caña		Tratamiento III Caña	Tratamiento IV Mezcla en frío	
Agave	Vainilla	Agave	Madera	Especias	Agave	Vainilla
Anís	Fermentado	Anís	Alcohol	Herbal	Especias	Vinagre-picante
Dulce	Almendra	Dulce	Vainilla	Alcohol	Alcohol	Dulce
Especias	Frutal	Especias		Anís	Madera	
Vinagre-picante	Alcohol	Vinagre-picante		Vinagre-picante	Herbal	
Frutos secos		Frutos secos		Cítrico	Anís	
Hojas húmedas		Hojas húmedas		Dulce	Hojas húmedas	

Tabla 5. Lista de descriptores para los tratamientos.

Se corrió un análisis discriminante utilizando el programa estadístico XL STAT 2012 v.4.02 (Addinsoft SARL, New York, USA) con los resultados de las evaluaciones sensoriales realizadas a lo largo del proyecto con los tratamientos I, II, III y IV para cada fuente de variación, es decir destilados obtenidos de la propia fermentación de los azúcares provenientes del agave con destilados mezclados con la finalidad de determinar si el conjunto de variables (descriptores) logran separar las muestras de acuerdo a dichas fuentes.

La Lambda de Wilks para los Destilados 100 % agave, Destilado agave-caña, Destilado de caña y Mezcla en Frío, los resultados obtenidos indican que los jueces encuentran diferencias entre las muestras fue significativa ($p < 0.005$), es decir, los vectores medios de los tratamientos son diferentes. Una vez demostrado que existe separación en grupos se continuó con el análisis discriminante.

Prueba del Lambda de Wilks (aproximación de Rao):

Lambda	0.000
F (Valor observado)	12.284
F (Valor crítico)	6.684
GDL1	27
GDL2	4
p-valor	0.018
alfa	0.05

Interpretación de la prueba:

H0: Los vectores medios de los 4 clases son iguales.

Ha: Al menos uno de los vectores medios es diferente de otro.

Como el p-valor computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar la hipótesis nula H0, y aceptar la hipótesis alternativa Ha.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es menor que 1,84%.

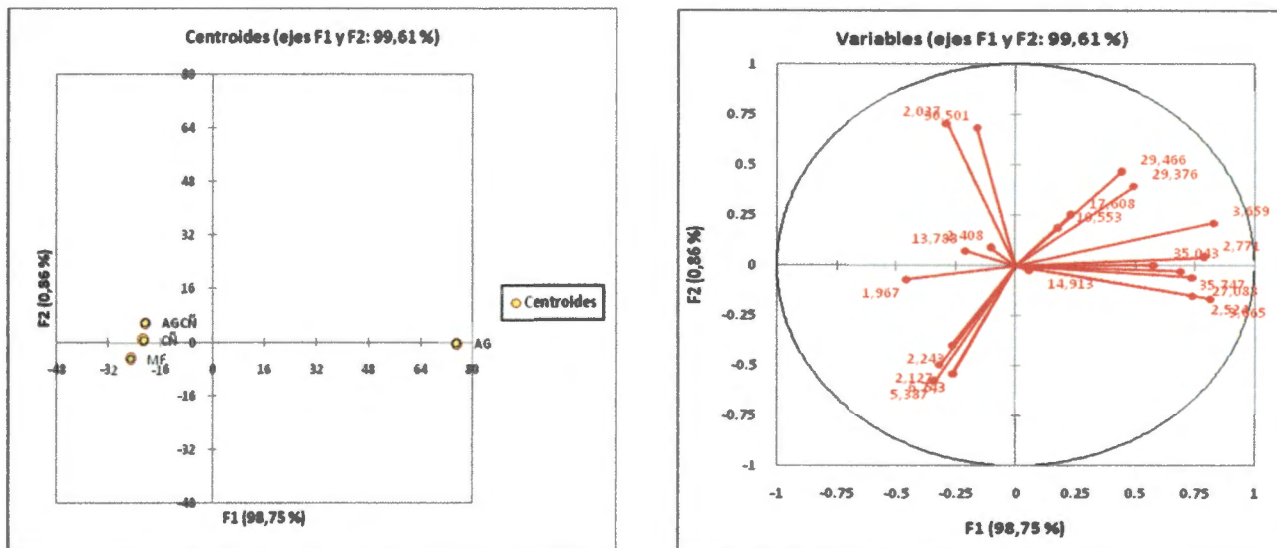


Figura 1. Vectores y centroides de descriptores para los destilados.

Para la gráfica de centroides (fig.1) se utilizaron las funciones 1 y 2 ya que juntas explican el 99.61% de la separación. La función 1 separa al tratamiento I (Destilado 100 % agave) del resto de los tratamientos.

Centroides:

	F1	F2	F3
AG	75.033	-0.293	-0.079
AGCÑ	-20.571	5.827	-2.293
CÑ	-21.025	0.747	4.490
MF	-25.078	-4.712	-1.589

Posteriormente a realizar el análisis discriminante, se corrió el análisis de varianza para los descriptores únicamente que obtuvieron vectores con mayor correlación con las funciones discriminantes y que por ende contribuyen mayormente con la separación de los grupos. Los análisis estadísticos mencionados anteriormente se realizaron para los cuatro destilados.

Matriz de confusión para la muestra de estimación:

de \ a	AG	AGCÑ	CÑ	MF	Total	% correcto
AG	3	0	0	0	3	100.00%
AGCÑ	0	3	0	0	3	100.00%
CÑ	0	0	3	0	3	100.00%
MF	0	0	0	4	4	100.00%
Total	3	3	3	4	13	100.00%

Conclusiones

- La duración de la Fermentación para los tres Tratamientos fue de 3 días siendo el rendimiento más alto el de Agave con 99.3 %
- Los resultados de la destilación para el porcentaje de alcohol volumen son satisfactorios de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana para el Tequila NOM-006-SCFI-2005 y para Ron la Norma Mexicana NMX-V-002-NORMEX-2010.
- Los resultados cromatograficos muestran diferencias en la composición volátil de cada destilado analizado, presentando el menor número de picos la mezcla en frío.
- Los compuestos volátiles cuantificados fueron: acetato de etilo, metanol, etanol, propanol, lactato de etilo, ácido acético y furfural.
- Los dos destilados y sus compuestos volátiles fueron agrupados por el PCA en dos componentes principales con una varianza explicada del 99.6%. Los destilados fueron claramente distinguidos el uno del otro.
- Se encontraron el 81.25 % de descriptores comparados con los reportados en literatura.
- El 62 % de los descriptores de olor encontrados coincide con los reportados en la bibliografía.
- Los jueces seleccionados encuentran diferencias entre las muestras presentadas.
- Los destilados fueron significativamente diferentes en aroma, gusto y sensaciones táctiles ($P < 0.05$).
- Adicionalmente la prueba "A" "No-A" terminó por confirmar las diferencias entre los destilados.

Cronograma de actividades

Actividad	Primer Trimestre	Segundo Trimestre	Tercer Trimestre
Investigación bibliográfica	X	X	X
Establecer las condiciones de fermentación y destilación para dos destilados de agave a partir de: * Mezcla de destilado agave más destilado de caña. * Destilado procedente de la fermentación de agave y caña juntos.	X	X	
Establecimiento de las técnicas de análisis instrumental para identificar los componentes volátiles.	X		
Análisis Fisicoquímico (volumétrico)	X	X	
Análisis de cromatografía y Manejo de Equipo Cromatográfico (FID, MS)		X	X
Estudio sensorial (Prueba A NO-A)		X	X
Participación con un poster en congreso			X
Reporte final			X

ANEXOS

México D.F. 16 de Noviembre del 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

CUESTIONARIO PRUEBA "A-NO A"

Se te presenta una muestra A (o referencia) y cuatro muestras codificadas. Huele la muestra A y posteriormente cada una de las muestras codificadas, indica encerrando o marcando con una X en cada caso si la muestra es igual a A o diferente de A.

Muestra 8234	Igual a A	Diferente de A
Muestra 2812	Igual a A	Diferente de A
Muestra 5198	Igual a A	Diferente de A
Muestra 3491	Igual a A	Diferente de A

Finalmente describe por favor cada una de las muestras codificadas indicando lo siguiente:

Muestra 8234

Olor:

Sabor:

Muestra 2812

Olor:

Sabor:

Muestra 5198

Olor:

Sabor:

Muestra 3491

Olor:

Sabor:

¡MUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

CUESTIONARIO PRUEBA "A-NO A"

Se te presenta una muestra A (o referencia) y tres muestras codificadas. Huele la muestra A y posteriormente cada una de las muestras codificadas, indica encerrando o marcando con una X en cada caso si la muestra es igual a A o diferente de A.

Muestra 5730	Igual a A	Diferente de A
Muestra 9356	Igual a A	Diferente de A
Muestra 3714	Igual a A	Diferente de A

Finalmente prueba las muestras una por una, y escoge de la lista de descriptores que se te presentan cuales son los que identificas en cada una de las muestras, si gustas puedes añadir otros descriptores en el espacio de abajo:

5730		9356		3714	
Agave	Frutos secos	Agave	Frutos secos	Agave	Frutos secos
Anís	Herbal	Anís	Herbal	Anís	Herbal
Chocolate	Hojas húmedas	Chocolate	Hojas húmedas	Chocolate	Hojas húmedas
Cítricos	Madera	Cítricos	Madera	Cítricos	Madera
Dulce	Vainilla	Dulce	Vainilla	Dulce	Vainilla
Espicias	Vinagre-picante	Espicias	Vinagre-picante	Espicias	Vinagre-picante
Floral		Floral		Floral	

Nombre:

Correo electrónico:

IMUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!

México D.F. 29 de Noviembre del 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

CUESTIONARIO PRUEBA "A-NO A"

Se te presenta una muestra A (o referencia) y tres muestras codificadas. Huele la muestra A y posteriormente cada una de las muestras codificadas, indica encerrando o marcando con una X en cada caso si la muestra es igual a A o diferente de A.

Muestra 6324 Igual a A Diferente de A
Muestra 1840 Igual a A Diferente de A
Muestra 9187 Igual a A Diferente de A

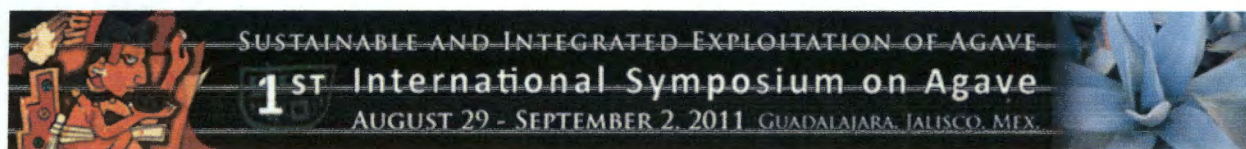
Finalmente prueba las muestras una por una, y escoge de la lista de descriptores que se te presentan cuales son los que identificas en cada una de las muestras, si gustas puedes añadir otros descriptores en el espacio de abajo:

6234		1840		9187	
Agave	Frutos secos	Agave	Frutos secos	Agave	Frutos secos
Anís	Herbal	Anís	Herbal	Anís	Herbal
Chocolate	Hojas húmedas	Chocolate	Hojas húmedas	Chocolate	Hojas húmedas
Cítricos	Madera	Cítricos	Madera	Cítricos	Madera
Dulce	Vainilla	Dulce	Vainilla	Dulce	Vainilla
Especias	Vinagre-picante	Especias	Vinagre-picante	Especias	Vinagre-picante
Floral	Alcohol	Floral	Alcohol	Floral	Alcohol

Nombre:

Correo electrónico:

IMUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!



Caracterización de componentes volátiles en destilados de agave y caña con fines de apoyo a la denominación de origen del Tequila.

Diana Martínez Rodríguez, José Ramon Verde Calvo*, Frida Malpica Sanchez, Hector Bernardo Escalona Buendía
UAM- Iztapalapa, Dpto. de Biotecnología, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina 09340 México D.F. * jrcv@xanum.uam.mx

Palabras clave: Tequila, Denominación de origen y Destilado de caña

Introducción.

Entre las bebidas más reconocidas del País se encuentra el Tequila, producto protegido por una Denominación de Origen (D.O.), por otro lado en el mercado existen bebidas denominadas Destilados de Agave que se obtienen de fermentar una parte de agave con otra de jugo de caña, la D.O. del Tequila establece los tipos de agave que son permitidos para su elaboración así como el lugar donde se cultiven. El objetivo del siguiente trabajo es el estudio de las diferencias en la composición de los compuestos volátiles de tres bebidas obtenidas de: 1) Destilado de agave 100 % (*azul tequilana weber*).

- 2) Destilado de caña 100 % (*Saccharum officinarum*).
- 3) Destilado procedente de la fermentación de agave y caña (50:50).

Metodología.



Figura 1. Diagrama de Flujo

Resultados y Discusión.

Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 3 días y no hubo diferencia entre las cinéticas de estos.

Análisis	Tratamiento I	Tratamiento II	Tratamiento III
°Bx (%)	22	13.4	12
pH	4.5	4.3	4.4
ARD (g/100mL)	22.6	10.74	11.72
% Alc. Vol.	41.5	44	55

Tabla 1. Resultados obtenidos de los Tratamientos I (Fermentación y Destilación de 100% Agave), Tratamiento II (Fermentación y Destilación de 50:50 mezcla Agave-Caña) y Tratamiento III (Fermentación y Destilación 100 % Caña)

Los resultados fisicoquímicos muestran diferencias entre los tratamientos, en cuanto al nivel de azúcares se puede ver una mayor concentración en el tratamiento I y los resultados obtenidos de la segunda destilación de los productos muestran congruencia con lo especificado en la Normas Oficial Mexicana del Tequila (NOM-006-SCFI-2005), alcohol volumen 35-55 %.

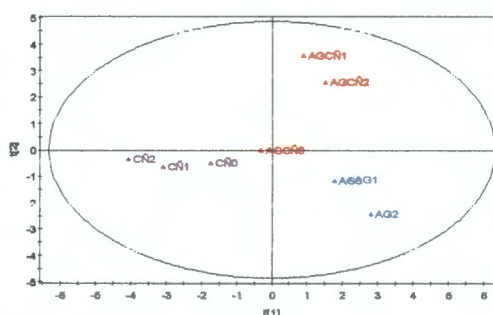


Figura 2: Grafica de Scores PLS-Discriminante. Separación de las tres muestras por análisis discriminante.

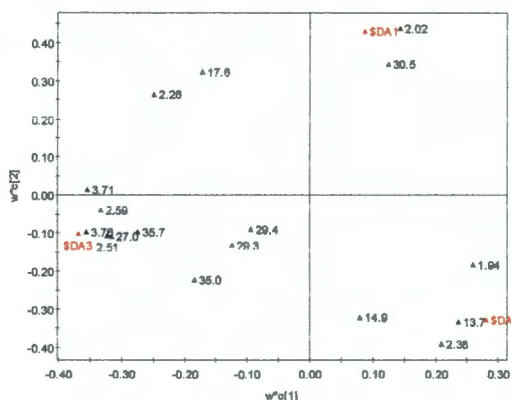


Figura 3: Grafica de Coeficientes PLS-Discriminante. Los números indican los tiempos de retención (min) de los compuestos identificados: Metanol (1.01), Acetaldehído (1.959), Etanol (2.04), Acetato de Etilo (2.55), Acido acético (2.23), Furfural (6.04) y Alcohol Amílico (3.02).

La figura 1 permite visualizar que las muestras evaluadas, se separan bien en tres a pesar de que una repetición del destilado agave-Caña fue diferente. La figura 2 permite visualizar el grado de asociación de las variables (con base en sus tiempos de retención) y aquellos que separan mejor los grupos (tratamientos). Todos los compuestos del lado derecho se asocian a las muestras con agave y del izquierdo a los que solo tuvieron caña. Los compuestos en el cuadrante superior derecho fueron distintivos del destilado agave-caña, mientras que los del inferior derecho fueron distintivos de las muestras 100 % agave.

Conclusiones: La composición de compuestos volátiles en cada tratamiento permite su diferenciación.

Bibliografía.

1. Melchor, Arellano. (2008). Characterization of kinetic parameters of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. 2008. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 835-841
2. CIATEJ (2004). Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas. Goehedler, A.C. Guadalajara, Jalisco, México. 196-226.
3. Prado, R. (2005). The role of distillation on the quality of tequila. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 701-708.

Bibliografía:

- 1) Covarrubias C.M., Capella V.S. (2006), "Correlación de compuestos volátiles del tequila con su origen" Revista Alfa Editores Técnicos, Bebidas Mexicanas (Diciembre 2006/Enero 2007). 10-17
- 2) Montero A.M.(2011), "Fraude al consumidor" Revista de la cadena Agave-Tequila Tecno Agave, Año 2, No. 10 (Mayo-Junio 2011) 26.
- 3) www.informador.com.mx/.../aseguran-en-jalisco-mas-de-tres-mil-litros-de-tequila-adulterado.htm
- 4) <http://canaljudicial.wordpress.com/2011/02/04/dan-resultados-de-programa-%E2%80%9Cmala-copa%E2%80%9D/>
- 5) Prado-Ramírez R, Gonzáles-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, Casillas N, Estarrón M & Gómez-Hernández H (2005) The role of distillation on the quality of tequila. *Int J Food Sci Technol* 40: 701–708.
- 6) Aguilar-Cisneros *et al.*, (2003) "Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses" *Eur Food Res Technol* (2003) 217:438–443.
- 7) Vallejo-Córdoba *et al.*, (2005) Vallejo-Córdoba B, González-Córdoba AF & Estrada-Montoya MC
- 8) Latest advances in the characterization of Mexican distilled agave beverages: tequila, mezcal and bacanora. AGFD-113 229th ACS meeting, San Diego, CA.
- 9) Benn y Peppard (1996), "Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis" *J Agric Food Chem* 44: 557–566.
- 10) Estarrón-Espinosa (1997) "Identificación de los principales compuestos volátiles que caracterizan al tequila 100% de agave". MSc Thesis, University of Guadalajara, Mexico.
- 11) Pinal L, Cedeño M, Gutierrez H & Alvarez-Jacobs J (1997) "Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process". *Biotechnol Lett* 19: 45–47.
- 12) Arizon *et al.* (1995) "Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages"
- 13) Vázquez H.J. (2007) "Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas", *Ingeniería, Investigación y Tecnología* VIII. 4. 249-259
- 14) Maciel C.A. (Mayo 2006). *Biocombustibles: Desarrollo histórico – tecnológico, mercados actuales y comercio internacional*, Sevilla, VI. 9-11.
- 15) Lachance MA (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 151–160.
- 16) Yuan K. L. (2006) "Microbial Biotechnology: Principles and Applications", World Scientific; Capítulo 8. 15-30.
- 17) Gschaedler Mathis A, Ramírez Cordova J, Diaz Montañó D, Herrera López H, Arellano Plaza M, Arizon Gaviño J & Pinal Zuazo L (2004) Fermentación: etapa clave en la elaboración del tequila. *Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas* (Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco, ed), pp. 63–120. CIATEJ, Guadalajara, Mexico.
- 18) Gabriel S.B. (2004) "Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Cap.1, 1,2.
- 19) Rogelio L.Z. (1999) "La historia del Tequila, de sus regiones y sus nombres" Ed. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, México, 51-75.
- 20) Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas Alcohólicas-Tequila, Especificaciones.
- 21) Gabriel S.B. (2004) "Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Cap.4, 90-92.
- 22) Melchor Arellano, Pelayo C., Ramírez J., Rodríguez I., (2008) "Characterization of Kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice". *J In Microbiol Biotechnol* 35:835-841.
- 23) Holland C. D. (1981) "Fundamentos y modelos de procesos de separación" Cap. 3, 45.
- 24) Gabriel S.B. (2004) "Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Cap.5, 144-145.

- 25) Prado-Ramírez R, Gonzáles-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, Casillas N, Estarrón M & Gómez-Hernández H (2005) The role of distillation on the quality of tequila. *Int J Food Sci Technol* 40: 701–708.
- 26) http://www.canaltrans.com/mordiendo_cristales/aguardientes/tequila.html
- 27) Badui D.S. (2006) "Química de los Alimentos" 4ta Ed. Person educación de México, S.A. de C.V., Cáp. 8, pág. 495-497.
- 28) Gabriel S.B. (2004) "Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Cap.6, 237-238.
- 29) Vernin, G., and Vernin, G. (1982) "Aromes Alimentaires: Developpements Récents" Ed. APRIA, Paris, 196-232.
- 30) Richard, H., (1992) "Connaissance de la Nature de Aromes. En les Aromes Alimentaires. Richard, H. y Multon, J.L., Cordinateurs. Ed. Tec & Doc Lavoisier APRIA, Paris. Cap. 1:22-37.
- 31) Yadad G.D. y Pujari A.A., (1999), "Kinetics of acetalization of perfumery aldehydes with alcohols over acid catalysis". *The Canadian J. of Chem Eng* 77, 489-496.
- 32) Etiévant P.X., (1991) "Volatile compounds in foods and Beverages" Maarse H Editor, Ed Deeker, Cap. 14: 483-546.
- 33) Cedeño M., Alvarez-Jacob, J. (2000) "Tequila production from agave" 3ra Edition, Murtagh & Associates (ed), Nottingham University press.
- 34) Villanueva S. (2003) "Evaluación sensorial, herramienta básica para una mejor calidad en la elaboración de alimentos" CIATEJ, Guadalajara Jalisco, México.
- 35) Plug H. y Haring P. (1994) "The influence of flavour ingredient interaction on flavor perception" *Food Qual. Pref.* 5:95-102.
- 36) Adda J y Richard H., (1992) "Análisis de aromas, preparación de extractos" Ed. Tec & Doc Lavoisier APRIA, Paris Cap. 12. 258-273.
- 37) Larios Medrano, I. (1995) "Caracterización del Tequila y su proceso de elaboración" Tesis de Maestría en Ciencias en Procesos Biotecnológicos.
- 38) ISO 4120:1983 Sensory Analysis Methodology Triangular test.
- 39) ISO 5495:1983 Sensory Analysis Methodology-Pared comparison test.
- 40) ISO 10399:1991 Sensory Analysis Methodology-Dúo-trío test.
- 41) ISO 8588:1987 Sensory Analysis Methodology "A" – "not A" test.
- 42) Gabriel S.B. (2004) "Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Cap.6, 244-250.
- 43) Determinación de azúcares reductores directos y totales-Métodos de ensayo prueba NMX-V-006-NORMEX-2005
- 44) Stichmair J.G., Fair J.R. (1998) "Distillation" Ed. Wiley-VCH New York.