PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO

AGARED

Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana
Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO

Estado del Arte publicado por AGARED- Red Temática Mexicana
Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CIATEJ

AGARED

Libro elaborado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Programa de Redes Temáticas de Investigación-Continuidad de Redes. Proyecto Num. 269948. Convocatoria 2016.

Título original: *Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México*

Primera Edición Electrónica 2017

© CONACyT, CIATEJ, AGARED

D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C

Av. Normalistas # 800
Col. Colinas de la Normal.
C.P. 44270 Guadalajara, Jal., México.
www.ciatej.mx
www.agared.org

ISBN: 978-607-97548-5-3

Coordinación
Gschaedler Mathis, Anne Christine

Coordinación Editorial
Villarreal Hernández, Sandra

Coordinación Capítulo 1
Gutiérrez Mora, Antonia

Coordinación Capítulo 2
Ortiz Basurto, Rosa Isela

Coordinación Capítulo 3
Moreno Terrazas Casildo, Ruben
Lappe Oliveras, Patricia Ester
Larralde Corona, Claudia Patricia

Coordinación Capítulo 4
Contreras Ramos, Silvia Maribel
Dávila Vázquez, Gustavo (†)

Coordinación Capítulo 5
Gallardo Váldez, Juan

Se autoriza la copia, impresión y descarga del presente material con fines divulgativos no comerciales ni de lucro, para el estudio privado, de investigación y docencia, siempre que se reconozcan de forma adecuada los créditos institucionales y autorales como las fuentes y titulares de los derechos.

Fecha de publicación: 15 de Agosto 2017

Corrección de Estilo
Atilano, Norma

Diseño Editorial
Saenz Ramos, Alejandra

Ilustración
Del Toro Ruiz, Antonio

Fotografía
Gschaedler Mathis, Anne Christine
Hernández Velarde, Luis Gerardo

DIRECTORIO

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Dirección de Redes e Infraestructura Científica

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

AGARED
Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

INSTITUCIONES AGARED QUE PARTICIPARON EN LA OBRA

Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT)

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD)

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ)

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY)

Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Guadalajara)

Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Irapuato)

Instituto Politécnico Nacional-Centro de Biotecnología Genómica (CBG)

Instituto Tecnológico de Durango (ITD)

Instituto Tecnológico de Tepic (ITT)

Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco (ITTJ)

Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVER)

Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG)

Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP)

UASLP-Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD)

Universidad de Guadalajara-Centro Universitario
de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI)

Universidad de Guanajuato (UG)
Campus Irapuato- Salamanca

Universidad Iberoamericana (UIA)

Universidad Nacional Autónoma de México-
Instituto de Biología (IB-UNAM)

Universidad Nacional Autónoma de México-
Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM)

Universidad Nacional de la Cañada (UNCA)

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas
(UNICACH)-Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad Politécnica de Pachuca (UPP)

Universidad Politécnica de Tlaxcala (UPT)

Universidad de Sonora (US)

Universidad Tecnológica de Tecamachalco (UTT)

Universidad Veracruzana (UV) Facultad de Biología

RELACIÓN DE AUTORES (POR ORDEN ALFABÉTICO)

1. Aguirre Rivera, Juan Rogelio
(enlace institucional IIZD)
Universidad Autónoma de San Luis Potosí- Instituto de Investigación de Zonas Desérticas.

2. Aldrete Herrera, Pamela Isabel
(miembro estudiante)
Instituto Tecnológico de Tepic.

3. Álvarez Ainza, Maritza Lizeth
(enlace institucional US)
Universidad de Sonora- Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

4. Amaya Delgado, Lorena
(miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

5. Andrade González, Isaac
(enlace institucional ITTJ)
Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco.

6. Arellano Plaza, Melchor
(miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

7. Armenta Corral, Rosa Idalia
(miembro investigador)
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

8. Arreola Vargas, Jorge (miembro investigador)
Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías.

9. Arrizon Gaviño, Javier Plácido
(miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

10. Beltrán García, Miguel Juan
(miembro investigador)
Universidad Autónoma de Guadalajara.

11. Calderón Santoyo, Montserrat
(miembro investigador)
Instituto Tecnológico de Tepic.

12. Camacho Ruíz, Rosa María
(enlace institucional CIATEJ)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

13. Castro Díaz, Alfredo Salvador
(enlace institucional UTT)
Universidad Tecnológica de Tecamachalco.

14. Contreras Medina, David Israel
(miembro investigador)
Catedrático CONACYT – CIATEJ.

15. Contreras Ramos, Silvia Maribel
(CTA ampliado academia)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

16. Cházaro Basáñez, Miguel de Jesús
(miembro investigador)
Universidad Veracruzana- Facultad de Biología.

17. Dávila Vázquez, Gustavo (†)
(miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

18. De la Mora, Amutio, Marcela
(miembro investigador)
Universidad Autónoma de Guadalajara

19. De la Rosa Miranda, Mayela (miembro externo)
Universidad Iberoamericana- Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas.

20. De la Torre, González, Francisco Javier (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

21. Escalante Lozada, José Adelfo (enlace institucional IBT-UNAM)
Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biotecnología- Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis.

22. Figueroa Galván, Nashyeli (miembro externo)

23. Gallardo Valdez, Juan (CTA ampliado vinculación)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

24. García Barrón, Sergio Erick (miembro estudiante)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

25. García Galaz, Alfonso (miembro investigador)
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

26. García Mendoza, Abisaí Josué (CTA ampliado difusión)
Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biología- Jardín Botánico.

27. Godínez Hernández, César Iván (miembro estudiante)
Universidad Autónoma de San Luis Potosí- Instituto de Investigación de Zonas Desérticas.

28. Gómez Leyva, Juan Florencio (miembro investigador)
Instituto Tecnológico de Tlajomulco Jalisco.

29. González Ávila, Marisela (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

30. Gschaedler Mathis, Anne Christine (responsable técnico de la red)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

31. Gutiérrez Mora, Antonia (CTA ampliado vinculación)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

32. Guzmán Mendoza, Rafael (miembro investigador)
Universidad de Guanajuato- Campus Irapuato- Salamanca.

33. Herrera López, Enrique Jaime (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

34. Juárez Flores, Bertha Irene (miembro investigador)
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

35. Lappe Oliveras, Patricia Ester (CTA internacionalización/ enlace institucional IB-UNAM)
Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biología- Departamento de Botánica.

36. Larralde Corona, Claudia Patricia (CTA academia/enlace institucional CBG)
Instituto Politécnico Nacional - Centro de Biotecnología Genómica.

37. López López, Alberto (†) (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

38. López Miranda, Javier (miembro investigador)
Instituto Tecnológico de Durango.

39. López Pérez, Mercedes Guadalupe (enlace institucional CINVESTAV- Irapuato) *Instituto Politécnico Nacional - Centro de Investigación y de Estudios Avanzados- Unidad Irapuato.*

40. Magaña Mendoza, María Gabriela (Miembro estudiante) *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.*

41. Martínez Ramón, Javier (miembro investigador) *Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biología- Jardín Botánico.*

42. Martínez Rodríguez, Julia del Carmen (enlace institucional UAG) *Universidad Autónoma de Guadalajara.*

43. Mellado Mojica, Erika (miembro investigador) *Instituto Politécnico Nacional- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados- Unidad Irapuato.*

44. Méndez Acosta, Hugo Óscar (enlace institucional CUCEI) *Universidad de Guadalajara- Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías.*

45. Mendoza Rivera, Mariana de los Ángeles (miembro estudiante) *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.*

46. Mercado Flores, Yuridia (enlace institucional UPP) *Universidad Politécnica de Pachuca.*

47. Moreno Terrazas C, Rubén (CTA difusión/enlace institucional UIA) *Universidad Iberoamericana- Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas.*

48. Moreno Vilet, Lorena (miembro investigador) *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.*

49. Narváez Zapata, José Alberto (miembro investigador) *Instituto Politécnico Nacional - Centro de Biotecnología Genómica*

50. Nieto Sotelo, Jorge (miembro investigador) *Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biología- Jardín Botánico.*

51. Orantes García, Carolina (miembro investigador) *Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas- Instituto de Ciencias Biológicas.*

52. Ordaz Hernández, Armando (miembro externo) *Universidad de la Cañada.*

53. Ortega Sánchez, Eric (enlace institucional UPT) *Universidad Politécnica de Tlaxcala.*

54. Ortiz Basurto, Rosa Isela (CTA academia/enlace institucional ITT) *Instituto Tecnológico de Tepic.*

55. Páez Lerma, Jesús Bernardo (miembro investigador) *Instituto Tecnológico de Durango.*

56. Palafox González, Liliana (miembro investigador) *Universidad Tecnológica de Tecamachalco.*

57. Palomino Hasbach, María Guadalupe Antonia (miembro investigador)-*Universidad Nacional Autónoma de México- Instituto de Biología- Jardín Botánico.*

58. Pardo Nuñez, Joaline (miembro investigador) *Catedrático CONACYT – CIATEJ.*

59. Prado Ramírez, Rogelio (miembro investigador) *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.*

60. Pérez Ramírez, Miguel (miembro estudiante)
Universidad Veracruzana.

61. Quiñones Aguilar, Evangelina Esmeralda (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

62. Quí Zapata, Joaquín Alejandro (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

63. Ragazzo Sánchez, Juan Arturo (miembro investigador)
Instituto Tecnológico de Tepic.

64. Ramos Clamont Montfort, Gabriela (enlace institucional CIAD)
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

65. Rentería Martínez, Óscar (miembro estudiante)
Instituto Tecnológico de Durango.

66. Rincón Enríquez, Gabriel (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

67. Rodríguez Garay, Benjamín (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

68. Rodríguez González, Ernesto (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.

69. Sánchez Carmona, Arturo (enlace institucional CINVESTAV- Guadalajara)
Instituto Politécnico Nacional- Centro de Investigación y Estudios Avanzados- Unidad Guadalajara.

70. Sánchez Osorio, Ever (miembro investigador)
Catedrático CONACYT- CIATEJ.

71. Sánchez Teyer, Lorenzo Felipe (enlace institucional CICY)
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

72. Soto Cruz, Nicolás Óscar (enlace institucional ITD)
Instituto Tecnológico de Durango.

73. Tamayo Ordóñez, María Concepción (miembro investigador)
Instituto Politécnico Nacional - Centro de Biotecnología Genómica.

74. Tapia Campos, Ernesto (miembro investigador)
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

75. Téllez Jurado, Alejandro (miembro investigador)
Universidad Politécnica de Pachuca.

76. Torres Martínez, Daniel (miembro investigador)
Universidad Politécnica de Tlaxcala.

77. Vázquez Elorza, Ariel (miembro investigador)
Catedrático CONACYT- CIATEJ.

78. Velez Jiménez, Arturo (miembro externo)
Proyecto agaves

79. Verdugo Valdez, Alma Gabriela (enlace institucional UNICACH)
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas- Instituto de Ciencias Biológicas.

80. Villalobos Serrano, Luis Felipe (miembro externo)
Cámara Nacional de la Industria Tequilera

INTRODUCCIÓN

Los agaves, plantas emblemáticas de México, han sido aprovechadas desde tiempos ancestrales y hoy en día se siguen utilizando en varias aplicaciones, la más conocida quizá, es la producción de bebidas alcohólicas destiladas o no destiladas. A lo largo de los años los temas de investigación se han diversificado abordando temas como las enfermedades de los agaves, los fructanos de agave (caracterización y aplicación como ingrediente), bebidas destiladas de agave (diferentes al tequila), aprovechamiento de los subproductos de la industria, biocombustibles, entre otros temas que se relacionan con ámbitos socioculturales e incluso, socioeconómicos.

Al ser los agaves y sus derivados un tema de investigación de muchas instituciones mexicanas y algunas extranjeras, para AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves - es fundamental hacer una revisión de las diferentes aplicaciones que surgen de esta planta y que son de gran potencial para el desarrollo tanto de la ciencia como de las culturas, así como compilar y resumir gran parte de la información disponible en estas temáticas, plasmadas en esta obra titulada "Panorama del aprovechamiento de los agaves en México".

Con dicho trabajo buscamos generar una guía para, además de mostrar cuál es el estado del arte de algunas de estas investigaciones, reflexionar sobre cuáles acciones faltan por implementar, para lograr que los agaves puedan no sólo tener un impacto en lo económico, sino que se logren acciones que permitan hacer sustentable el uso de esta planta tan bondadosa.

La obra dividida en cinco grandes capítulos revisa en un inicio a los agaves como materia prima, abordando temas muy diversos como taxonomía, fisiología de los agaves, problemas de enfermedades, entre otras. Los fructanos, su caracterización y sus aplicaciones son el principal tema del segundo capítulo. El tercer capítulo aborda la elaboración de bebidas a partir de diferentes especies de *Agave*, considerando bebidas destiladas o no. En un cuarto capítulo la importancia del aprovechamiento de los residuos y subproductos es discutida y, finalmente en un quinto capítulo, se abordan temáticas relacionadas con el aspecto social, político y económico de este complejo sector relacionado con el aprovechamiento de los agaves.

Este trabajo escrito por 80 integrantes de esta red de investigación, que inició sus actividades en el año 2015, es además reflejo de la pruralidad de contenidos como una fortaleza en la generación de productos para la divulgación de la ciencia.

El principal objetivo de la red, es conformar y consolidar una red multidisciplinaria mediante sinergias de investigadores y estudiantes nacionales, internacionales así como empresas, fomentando la comunicación para incentivar la colaboración entre sus integrantes en un contexto académico-científico haciendo énfasis en la vinculación con el sector productivo.

Finalmente quiero agradecer todos los integrantes de AGARED que contribuyeron esta obra, así como a muchas de las actividades desarrolladas a lo largo de más de dos años de actividades y en particular a nuestros compañeros y colegas Karla Carillo Rodríguez, Gustavo Dávila Vázquez y Alberto López López.

Dra. Anne C. Gschaedler Mathis
Responsable Técnico AGARED

ÍNDICE

1. AGAVE 15

Resumen 17
1.1 Introducción 19
1.2 Sistemática, filogenia y taxonomía del género *Agave* 21
1.3 Caracterización molecular 24
1.4 Fisiología de agaves 26
1.5 Micropropagación 29
1.6 Mejoramiento genético 33
1.7 Caracterización citogenética, cromosomas y citometría de flujo 36
1.8 Ecología microbiana del agave: perspectivas y bacterias endófitas 43
1.9 Microorganismos asociados a las plantas de agave, microorganismos fitopatógenos y estrategias de control biológico 45
1.10 Agroecología 49
1.11 Conclusiones 51
1.12 Referencias 53

2. FRUCTANOS DE AGAVE: ACTUALIDAD Y PERSPECTIVAS 69

Resumen 71
2.1 Introducción 73
2.2 Tipos de estructuras 74
2.3 Procesos para la obtención y modificación de fructanos 79
2.4 Métodos para la hidrólisis de fructanos de agave 82
2.5 Bioconjugado 84
2.6 Secado 84
2.7 Fructanos de agave como materia prima y su caracterización 85
2.8 Métodos para la caracterización de los fructanos de agave 86
2.9 Métodos de cuantificación de fructanos en alimentos 89
2.10 Efecto biológico de los fructanos de agave 90
2.11 Efecto biológico *ex vivo* de los fructanos de agave 97
2.12 Ingredientes alimenticios y productos 99
2.13 Desarrollo de nuevos productos 103
2.14 Normatividad de los fructanos de agave 104
2.15 Problemática y propuestas de soluciones 106
2.16 Conclusiones 107
2.17 Referencias 108

3. BEBIDAS TRADICIONALES Y NUEVAS ALTERNATIVAS **121**

SECCIÓN I. BEBIDAS REFRESCANTES Y ALCOHÓLICAS DE AGAVE **123**

Resumen **123**
3.1 Introducción **124**
3.2 Agua de lechugilla **126**
3.2.1 Introducción **126**
3.2.2 Definición y composición **126**
3.2.3 Historia de la bebida **126**
3.2.4 Información técnica general **127**
3.2.5 Estado actual del conocimiento **128**
3.2.6 Análisis de la problemática específica **129**
3.2.7 Industrialización y retos tecnológicos del agua de lechuguilla **130**
3.2.8 Conclusiones y perspectivas **130**
3.3 El pulque: bebida ancestral que perdura hasta la actualidad **131**
3.3.1 Introducción **131**
3.3.2 Definición y composición del pulque **132**
3.3.3 Historia del pulque **133**
3.3.4 Información técnica general del pulque **136**
3.3.5 Fermentación del pulque **140**
3.3.6 Nivel de producción y comercialización **140**
3.3.7 Estado actual del conocimiento **142**
3.3.8 Toxicología del pulque **148**
3.3.9 Propiedades medicinales del pulque **149**
3.3.10 Análisis de la problemática específica **150**
3.3.11 Fermentación **152**
3.3.12 Sabor del pulque **153**
3.3.13 Industrialización y retos tecnológicos del pulque **154**
3.3.14 Conservación del pulque y envasado **155**
3.3.15 Definición de una nueva normatividad sobre aguamiel y pulque **156**
3.3.16 Conclusiones y perspectivas **156**
3.4 Comiteco **158**
3.4.1 Definición y composición **158**
3.4.2 Estado del arte **159**
3.4.3 Historia del comiteco **159**
3.4.4 Proceso de elaboración **160**
3.4.5 Nivel de producción y comercialización **161**
3.4.6 Análisis de la problemática del comiteco **161**
3.4.7 Industrialización y retos tecnológicos **162**
3.4.8 Conclusiones y perspectivas **163**

SECCIÓN II. BEBIDAS DESTILADAS DE AGAVE **165**

Resumen **165**
3.5 Introducción **166**
3.6 El mezcal **167**
3.6.1 Historia **167**
3.6.2 Proceso de elaboración **167**
3.6.3 Estado actual del conocimiento **168**

3.6.4 Análisis de la problemática específica del mezcal 168
3.7 Mezcal de Durango 169
3.7.1 Historia 169
3.7.2 Información técnica general 169
3.7.3 Nivel de producción y comercialización 170
3.7.4 Estado actual del conocimiento 170
3.7.5 Industrialización y retos tecnológicos en Durango 170
3.8 Mezcal de Michoacán 171
3.8.1 Historia 171
3.8.2 Proceso de elaboración 171
3.8.3 Nivel de producción y comercialización 173
3.8.4 Estado actual del conocimiento 174
3.8.5 Análisis de la problemática específica 174
3.8.6 Industrialización y retos tecnológicos 175
3.9 Mezcal de Oaxaca 176
3.9.1 Historia 176
3.9.2 Proceso de elaboración 177
3.9.3 Nivel de producción y comercialización 178
3.9.4 Estado actual del conocimiento 178
3.9.5 Análisis de la problemática específica 179
3.9.6 Industrialización y retos tecnológicos 179
3.10 Mezcal de San Luis Potosí 180
3.10.1 Historia 180
3.10.2 Proceso de elaboración 180
3.10.3 Nivel de producción y comercialización 180
3.10.4 Estado actual del conocimiento 181
3.10.5 Análisis de la problemática específica 181
3.10.6 Industrialización y retos tecnológicos 181
3.11 Mezcal de Tamaulipas 182
3.11.1 Historia 182
3.11.2 Proceso de elaboración 183
3.11.3 Nivel de producción y comercialización 183
3.11.4 Estado actual del conocimiento y problemática específica 183
3.11.5 Industrialización y retos tecnológicos 183
3.12 Mezcal de Zacatecas 184
3.12.1 Historia 184
3.12.2 Proceso de elaboración 184
3.12.3 Nivel de producción y comercialización 184
3.12.4 Estado actual del conocimiento y problemática específica 185
3.12.5 Industrialización y retos tecnológicos 185
3.13 El bacanora 186
3.13.1 Historia 186
3.13.2 Proceso de elaboración 186
3.13.3 Nivel de producción y comercialización 187
3.13.4 Estado actual del conocimiento 187
3.13.5 Análisis de la problemática específica del bacanora 188
3.13.6 Industrialización y retos tecnológicos del bacanora 188
3.14 La raicilla 189
3.14.1 Historia 190
3.14.2 Nivel de producción y comercialización 190
3.14.3 Estado actual del conocimiento 190

3.14.4 Industrialización y retos tecnológicos en la raicilla 191
3.15 El tequila 192
3.15.1 Definición 192
3.15.2 Historia 193
3.15.3 Información técnica general 194
3.15.4 Nivel de producción y comercialización 196
3.15.5 Estado actual del conocimiento 196
3.15.6 Análisis de la problemática específica del tequila 197
3.15.7 Conclusiones y perspectivas 197
3.16 Referencias 198

4. APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS 215

Resumen 217
4.1 Introducción 218
4.2 Residuos de agave 219
4.3 Procesos 223
4.4 Biocombustibles líquidos 224
4.5 Biocombustibles gaseosos 228
4.6 Enzimas 232
4.7 Bioactivos 234
4.8 Biofertilizantes 236
4.9 Perspectivas y recomendaciones 238
4.10 Referencias 240

5. PERSPECTIVAS SOCIALES, HISTÓRICAS Y ECONÓMICAS DEL AGAVE EN MÉXICO: UNA MIRADA A SUS PROBLEMÁTICAS, PRODUCCIÓN, APROVECHAMIENTO Y CONSUMO 249

Resumen 251
5.1 Introducción 253
5.2 El origen de las relaciones agave-sociedad. Aspectos culturales, sociales y económicos 255
5.3 La producción y consumo de agave en México 262
5.4 El entorno sociopolítico del agave: disputas por la regulación, producción y comercialización más allá de su utilidad primaria 267
5.5 El agave y su uso en la ciencia y tecnología 274
5.6 La problemática en la cadena de valor del agave 279
5.7 Perspectivas 284
5.8 Impactos ambientales de la producción de mezcal 286
5.9 Conclusiones 292
5.10 Referencias 293

1. AGAVE

PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO
Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

García Mendoza, A.J., Cházaro Basañez, M.J., Nieto Sotelo, J., Sánchez Teyer, L.F., Tapia Campos, E., Gómez Leyva, J. F., Tamayo Ordóñez, M., Narváez Zapata, J.A., Rodríguez Garay, B., Palomino Hasbach, G.A., Martínez Ramón, J., Martínez Rodríguez, J.C., Quiñones Aguilar, EE., Rincón Enríquez, G., Beltrán García, MJ., Quí Zapata, J.A., Guzmán Mendoza, R., Mercado Flores, Y., Ragazzo Sánchez, J.A., Calderón Santoyo, M., Gutiérrez Mora, A.

RESUMEN

Los agaves pertenecen a la familia Asparagaceae y forman la subfamilia Agavoideae. La suma de adaptaciones morfológicas y fisiológicas a la sequía y temperatura permite a estas plantas adaptarse a una gran variedad de ambientes, lo que contribuye a su amplia dispersión.

No existe una filogenia de la familia Asparagaceae que permita delimitar los géneros que la conforman, especialmente de *Agave*, ya que queda en duda si se incluyen aquí los géneros herbáceos cercanos.

Independientemente del trabajo con marcadores moleculares, se ha iniciado un *"Atlas de la familia Asparagaceae"*, con toda la información que se recaba en una base de datos de la familia.

La caracterización molecular de la familia Asparagaceae, así como el conocimiento de sus genomas, se verán beneficiados gracias a la combinación de distintos enfoques moleculares con la aplicación de métodos de secuenciado masivo o Next Generation Sequencing (NGS) que permitirán conocer las funciones codificadas por sus genomas y deducir sus relaciones de parentesco.

Por otro lado, existen muchas especies de *Agave* que cuentan con protocolos específicos para la propagación masiva, principalmente por medio de proliferación de yemas axilares; sin embargo, es necesario señalar que muchos de estos protocolos pueden ser más efectivos en cuanto a tasas de propagación y calidad de las

plantas producidas. Es importante incrementar los trabajos de investigación básica respecto a los procesos de embriogénesis somática, principalmente en especies de interés comercial con propósitos de propagación masiva o bien para ser usados en el mejoramiento genético.

Globalmente existe poca actividad de investigación en cuanto al mejoramiento genético de especies de *Agave* de interés económico, por lo que es necesario incluir en estos trabajos investigación básica sobre la embriogénesis cigótica para facilitar el entendimiento de los procesos de desarrollo de la embriogénesis somática y que sea útil para aplicar herramientas biotecnológicas como la transformación genética y selección celular entre muchas otras; al igual que la caracterización del genoma de especies y variedades de *Agave* por su número cromosómico, la estructura de su cariotipo, el nivel de poliploidía y tamaño del genoma por citometría de flujo para estudios en taxonomía y mejoramiento genético.

Se abre la oportunidad de estudiar con más profundidad la ecología microbiana de las semillas de primera mano, ya que éstas son vehículos para la transmisión de los endófitos de generación en generación. Así mismo se requiere tener una base de datos de los microorganismos en los bulbillos e hijuelos derivados del rizoma, y evaluar su impacto en la transferencia de generación para conocer si la pérdida de algunos géneros hace que la planta sea más susceptible a enfermedades y demandante de fertilizantes para su crecimiento.

El agave es una planta que se encuentra inmersa en las múltiples dimensiones de la agroecología por lo que resulta necesario profundizar en el estado del arte y generar líneas de investigación multidisciplinarias que aborden a los agaves desde la perspectiva multifactorial de la agroecología.

Palabras clave: *Taxonomía, caracterización molecular, mejoramiento genético, microorganismos asociados, agroecología.*

1.1 INTRODUCCIÓN

Los agaves son plantas perennes que se encuentran en casi todos los tipos de vegetación de México, de manera especialmente abundantes en el matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio y bosque de *Pinus-Quercus*; habitan desde el nivel del mar hasta los 3,000 m de altitud, aunque crecen mejor en las montañas entre los 1,000 y 2,000 m (García-Mendoza, 2004).

Los agaves son plantas perennes que se encuentran en casi todos los tipos de vegetación de México...

Forman uno de los grupos más importantes de plantas desde el punto de vista cultural y económico, pues han sido aprovechados por el hombre americano durante miles de años, para la obtención de numerosos beneficios. Este género presenta un metabolismo tipo MAC (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) y posee otras adaptaciones fisiológicas y morfológicas, tales como: hojas suculentas, un sistema de raíces superficial, cutículas gruesas en la epidermis de la hoja y acumulación de ceras en la superficie; estas adaptaciones les ha permitido presentar una amplia dispersión en diferentes zonas geográficas con climas estresantes.

El cambio climático global y la extensión de los mercados de algunos productos de agave, como fructanos para diverso uso, tequila, mezcal y pulque entre otros, han ocasionado un interés creciente en estas plantas en el contexto nacional y global. En términos generales, las especies de *Agave* cultivadas y silvestres se desarrollan bien en áreas de escaza precipitación y en general bajo altas temperaturas debido a su metabolismo, lo cual les permite crecer y producirse en lugares donde otros cultivos no tienen probabilidades de prosperar. Recientemente, un interés creciente se ha cimentado en la posibilidad de la producción de biocombustibles con el fin de eliminar el uso de los derivados del petróleo y el carbón.

El cultivo de células y tejidos vegetales (CTV) de especies del género *Agave* ha sido utilizado con diversos fines desde hace muchos años, tal es el caso de la propagación masiva por medio de proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. Dichos procesos han sido utilizados también con el objetivo de almacenamiento y conservación, y con fines de mejoramiento genético.

Las particulares características morfológicas y de desarrollo de los agaves, han dificultado las acciones de mejoramiento genético; sin embargo, se reportan algunos esfuerzos realizados en México y otras partes del mundo utilizando vías convencionales, así como herramientas biotecnológicas.

Los usos variados del *Agave*, en combinación con sus adaptaciones únicas al estrés ambiental, justifica su consideración como un cultivo modelo MAC (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas). Evidencias recientes muestran que estas plantas se encuentran habitadas internamente por diversas comunidades microbianas como bacterias del filum de las proteobacterias, firmicutes y actinobacterias, además de hongos micorrízicos arbusculares. Sin embargo, importantes hallazgos muestran en plantas de *Agave tequilana* (*A. tequilana*) crecidas en arena un modelo para dilucidar la transferencia de nitrógeno orgánico a partir de inocular una bacteria endófita *Bacillus tequilensis* marcada con Nitrógeno 15, cuyo análisis rastrea la incorporación del nitrógeno 15 en los tejidos como resultados de la colonización de la planta por el endófito. Los hallazgos apoyan la hipótesis de que estas plantas con limitación de nutrientes pueden degradar y obtener nitrógeno de microbios endofíticos. Estos microorganismos que muestran estilos de vida, sin duda juegan un papel crucial en el desarrollo de la planta, en su crecimiento, condición física, y la diversificación. El aumento de la concienciación y la información sobre endófitos da una idea de la complejidad del microbioma planta. La aparición del concepto del *"microbioma planta"*; es decir, los genomas colectivos de los microorganismos que viven en asociación con las plantas, ha dado lugar a nuevas ideas en la propuesta de evolución de las plantas de agave.

1.2. SISTEMÁTICA, FILOGENIA Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO AGAVE

De acuerdo con un estudio reciente, los agaves pertenecen a la familia Asparagaceae y forman la subfamilia Agavoideae. La familia es endémica de América y se distribuye desde los límites de Estados Unidos de América con Canadá hasta Bolivia y Paraguay. Incluye 9 géneros (*Agave, Beschorneria, Furcraea, Hesperaloe, Hesperoyucca, Manfreda, Polianthes, Prochnyanthes,* y *Yucca*) con cerca de 330 especies. El centro de mayor riqueza y diversidad de la familia se encuentra en México donde se distribuyen 251 especies (76% del total), con 177 endémicas (70%) (García-Mendoza y Galván, 1995; García-Mendoza, 2002). El género más grande y diverso de la familia es *Agave* con 210 especies; México tiene 159, es decir, 75% del total, con 119 de ellas endémicas (García-Mendoza, 2011). El género *Agave* se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Ecuador.

La morfología de los agaves se describe de la siguiente manera: plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral, arregladas en roseta en el ápice de un tallo, suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa. Respecto a los márgenes, exhiben una gran diversidad morfológica: los dientes córneos se originan sobre proyecciones de tejido conocidas como mamilas, o bien se ubican sobre una banda córnea continua, mientras que, en algunas pocas es filífero y se desprende en fibras. La hoja por lo general termina en una espina que puede medir desde algunos milímetros hasta varios centímetros. La inflorescencia es de apariencia espigada en el subgénero *Littaea* y racemosa o paniculada en el subgénero *Agave*. El pedúnculo floral tiene brácteas que se reducen en tamaño desde la base hasta el ápice. Las flores son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero, poseen 6 tépalos de coloración verdoso-amarillento en muchas especies, aunque varían del blanquecino al rojo o al anaranjado; los estambres son 6, sobrepasan a los tépalos y se insertan en diferentes longitudes del tubo. En la base del tubo se disponen tres nectarios que producen néctar, principal atractivo de los polinizadores. El fruto es una cápsula seca, trilocular, con semillas dispuestas en dos hileras por lóculo, negras, aplanadas y rodeadas por un ala corta en su parte distal. La reproducción es sexual o asexual mediante la generación de hijuelos estoloníferos en la base del tallo, intrafoliar o bien surgir en las inflorescencias; éstos son llamados bulbillos (García-Mendoza, 2002).

Forman uno de los grupos más importantes de plantas desde el punto de vista cultural y económico, pues han sido aprovechados por el hombre americano durante miles de años, debido a la obtención de sus numerosos beneficios. Las plantas, sus órganos y sus derivados son utilizados como alimento (botones florales, bases de las hojas, quiote), bebidas (aguamiel, pulque, yahui ndodo, mezcal), combustible (hojas, tallo, quiote), material de construcción (quiotes, hojas), cerco vivo (plantas), medicina (hojas, jugos), obtención de fibra (hojas), etc. Su presencia en casi todo el país, permite el aprovechamiento de muchas especies y de todas las estructuras morfológicas de la planta, tanto de especies silvestres, como de variedades domesticadas, pasando por aquellas poblaciones con diferentes grados de manejo humano, causa por la que reciben numerosos

nombres comunes. Actualmente la obtención del mezcal es la actividad agroindustrial más importante y se hace por lo menos en 20 estados de la República, aprovechando poblaciones silvestres, protegidas y cultivadas. Sin embargo, la obtención del mezcal, está mostrando efectos notables sobre las poblaciones naturales, ya que la explotación intensiva de las mismas pone en riesgo a las especies e incluso podría llevarlas a la extinción (Delgado-Lemus *et al*., 2014).

Actualmente la obtención del mezcal es la actividad agroindustrial más importante y se hace por lo menos en 20 estados de la República...

Para la elaboración de bebidas destiladas (mezcal) se estima que se emplean 28 especies a nivel nacional, 14 en términos comerciales, 8 en forma local y 6 más se emplean ocasionalmente (García-Mendoza, 2010). Esta cifra que podría llegar hasta 50 especies según Colunga-GarcíaMarín *et al*., (2007) y se utilizan en 28 estados (Illsley-Granich, 2010). Los magueyes mezcaleros se distribuyen principalmente hacia el Occidente, Centro y Sur de México. En Oaxaca, el estado donde se utlizan más especies se emplean por lo menos 8 especies y numerosos cultivares de los cuales no se ha hecho un inventario completo. Los cultivares se conservan en los huertos, a lo largo de los caminos, como cercas vivas, en terrenos erosionados o dentro de sus hábitats naturales. Algunas especies utilizadas para la elaboración de pulque, mezcal, fibras y alimentos han sido protegidas o manejadas por el hombre desde hace siglos, por lo que se han diferenciado morfológicamente, y son de difícil identificación taxonómica.

El género fue propuesto por Linneo en 1753 con base en plantas ornamentales que crecían en diferentes jardines europeos. Hasta el momento se han descrito 210 especies del género, siendo Gentry (1982) quien más aportes ha hecho a la clasificación de las especies y del grupo. Gentry organizó el género por sus características florales y vegetativas. Los dos subgéneros se separaron por su tipo de inflorescencia y disposición de las flores. Organizó las especies en 20 grupos diferenciados por caracteres de las hojas y flores principalmente. Dahlgren *et al*., (1982, 1985) con base en criterios morfológicos, fitogeográficos, fitoquímicos y cladísticos definen a la familia Asparagaceae en un sentido estricto, delimitándola únicamente con 8 géneros, propuesta que es reforzada por los estudios filogenéticos moleculares de Clary y Simpson (1995), Bogler y Simpson (1995, 1996) y los morfológicos de Hernández (1995). Sin embargo, en las filogenias publicadas recientemente los géneros herbáceos *Polianthes* y *Prochnyanthes* se anidan sucesivamente dentro de *Agave* formando un clado monofilético. Con base a lo anterior, Thiede (2001) modifica la

circunscripción taxonómica tradicional de *Agave* para incluir a estos géneros herbáceos dentro de los agaves. Las filogenias reciententes del Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009) ubican al género *Agave* y los 8 géneros relacionados como la subfamilia Agavoideae dentro de la familia Asparagaceae, familia que tiene 143 géneros y 3,632 especies. En este sentido, Asparagaceae es difícil de delimitar, ya que morfológicamente es heterogénea y está pobremente caracterizada, para el caso de las Agavoideae. El análisis incluye menos del 5% de la totalidad de las especies y no se incluyen todos los grupos morfológicos.

Por otro lado, se puede mencionar que el estado del conocimiento de las especies de la familia Asparagaceae y en especial del género *Agave* está bien representada en los herbarios de México. Por ejemplo, el Herbario Nacional de México (MEXU) tiene cerca de 8,000 especímenes, los cuales se están georeferenciando y en poco tiempo será posible hacer mapas precisos con la distribución actual y potencial de las mismas. Asi mismo, la información de las etiquetas del herbario, proporcionan información precisa sobre la ubicación correcta de las especies y de los hábitats donde se desarrollan, así como de los usos que tienen. La asignación de los nombres correctos para cada taxón es un trabajo que conlleva mucho tiempo, puesto que hay que analizar un gran número de citas antiguas, lo que afortunadamente con el internet ha resultado en una tarea menos complicada.

Vale la pena señalar el hecho que de las 210 especies descritas hasta la fecha del género *Agave*, en su mayoría fueron descritas por botánicos extranjeros como fueron el alemán Principe Salm-Dyck (1773-1861), el norteamericano William Trelease (1857-1945), el alemán Alwyn Berger (1871-1931), y el norteamericano Howard S. Gentry (1903-1993). Es hasta 1993 cuando Abisai García-Mendoza y Jesús Palma-Cruz, describen *Agave isthmensis* de Oaxaca y en 1995, Miguel Cházaro describe *Agave wendtii* de Veracruz.

Revisando el libro de Pilbeam (2013)[1], se encuentra que en total sólo 16 especies han sido descritas por botánicos connacionales, a saber:

1. *Agave arcedoanoensis*
2. *Agave chazaroi*
3. *Agave garcia-mendozae*
4. *Agave gomezpompae*
5. *Agave isthmensis*
6. *Agave jimenoi*
7. *Agave manatlanicola*
8. *Agave montana*
9. *Agave ovatifolia*
10. *Agave petrophila*
11. *Agave pintilla*
12. *Agave rzedowskiana*
13. *Agave temacapulinensis*
14. *Agave tenuifolia*
15. *Agave valenciana*
16. *Agave vazquezgarciae*
17. *Agave wendtii*

1. Para consultar los datos bibliográficos de los estudios hechos sobre las especies mencionadas, véase Pilbeam, 2013.

1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La identificación de los agaves se basa principalmente en la morfología, primordialmente en los caracteres de la roseta, las hojas, la flor y la inflorescencia (Gentry, 2004). Debido a su carácter perenne, la identificación de muchas especies de *Agave* puede ser muy difícil o imposible si no se cuenta con la estructura floral y la inflorescencia. El uso de marcadores moleculares o códigos de barras genéticos (en inglés DNA barcodes) se ha vuelto un enfoque complementario al morfológico y bioquímico para identificar especies biológicas como las bacterias, hongos, animales y plantas (Kress y Erickson, 2012). Los códigos de barras son secuencias cortas de ADN ortólogas de una región estandarizada del genoma que funcionan a manera de *"etiquetas"* que permiten caracterizar y distinguir especies entre sí (Kress *et al*., 2005; Newmaster *et al*., 2006). La intención del uso de los códigos de barras genéticos radica en la idea de agilizar el reconocimiento de especies a una tasa mayor que el de la pérdida de biodiversidad. En el caso de las plantas, constituyen una herramienta que permite identificar sus partes aisladas (raíces, semillas, polen, etc.) o distintos estadios ontogenéticos (etapa sexual y asexual) con implicaciones que inclusive, alcanzan la protección de derechos de propiedad intelectual y el control de calidad a nivel de producción y procesamientos de sus productos (Kress *et al*., 2005; Erickson *et al*., 2008; Nock *et al*., 2008). La investigación en códigos de barras genéticos comenzó en el ámbito de la zoología (Hebert *et al*., 2003) en donde el gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (*COX1*) resultó muy adecuado, siendo usado con éxito también para identificar hongos; sin embargo, en las plantas, los genes mitocondriales tienen un uso limitado, debido a las bajas tasas de variabilidad de su genoma mitocondrial. El escenario antes descrito, generó una discusión mundial en torno a cuáles deberían ser los *loci* idóneos para la generación de los códigos de barras vegetales. Se considera que las secuencias génicas candidatas a ser consideradas como códigos de barras genéticos en plantas deberían contar con las siguientes características (Kress *et al*., 2005, Nock *et al*., 2011; Hollingsworth *et al*., 2009):

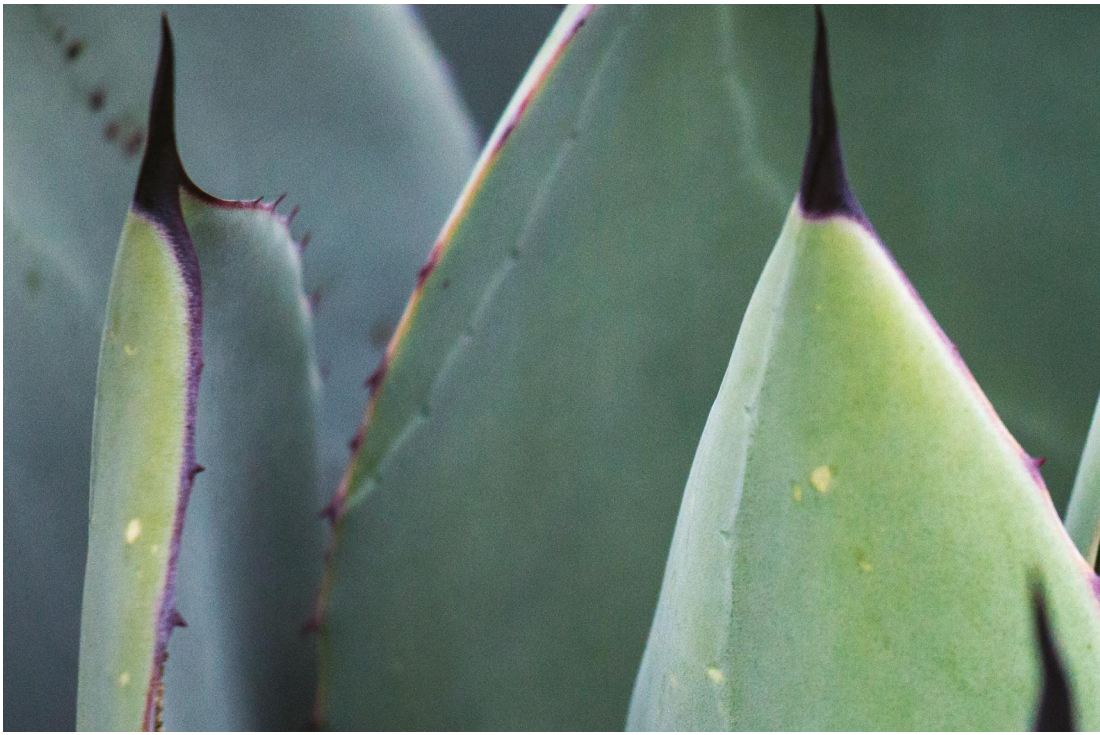
I. *Universalidad.* Debe contar con *loci* que puedan ser rutinariamente secuenciados a través de los distintos linajes de plantas terrestres.
II. *Calidad y cobertura*. Poseer secuencias con bi-direccionalidad con ninguna o pocas bases ambiguas, sitios a los flancos que permitan usar *primers* universales y tener un tamaño de secuencia corto.
III. *Discriminación.* Uso de *loci* que permitan que la mayor parte de las especies vegetales sean distinguidas, mostrando un nivel significativo de variabilidad y divergencia para la región amplificada.
IV. *Bioinformática.* Contar con algoritmos sencillos de alineación de la secuencia que permitan trabajar con numerosas muestras, presentando niveles altos de confianza en la asignación de especies.

En la literatura se reportan 5 genes con algunas de las cualidades mencionadas (Kress *et al*., 2012; Newmaster *et al*., 2005; Hollingsworth *et al*., 2009; Vijayan y Tsou, 2010; Whitlock *et al*., 2010): *rbc*L

(subunidad mayor de la RuBisCO del cloroplasto), *mat*K (maturasa K del cloroplasto), *trn*H-*psb*A (espaciador intergénico del cloroplasto), ITS (espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear), ITS2 (segundo espaciador transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear). El uso de la combinación de los 5 marcadores anteriores alcanza, en promedio, 70% de discriminación en plantas (Nicolalde-Morejón *et al*., 2011). Desafortunadamente, en el caso de la subfamilia Agavoideae, el uso de este juego de marcadores ha dado resultados muy pobres para discriminar especies adentro de y entre sus géneros (Bogler y Simpson, 1996; Good-Ávila *et al*., 2006; Bogler *et al*., 2006). Lo anterior obliga a desarrollar estrategias diferentes y a concluir que la supuesta universalidad de los marcadores moleculares no es alcanzable para el caso de las plantas. Sin embargo, sí es factible desarrollar marcadores que discriminen especies dentro de taxones específicos de plantas, como el de la subfamilia Agavoideae. Recientemente, el gen que codifica a la mayehuelina, un miembro de la familia proteica RIP (Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas) permitió discriminar un grupo de especies del género *Agave* (Nieto-Sotelo; Lledias; García-Mendoza; Martínez-Hernández *et al*., datos no publicados) que no había sido resuelto con el uso combinado de los 5 marcadores del código de barras (Bogler y Simpson, 1996; Good-Ávila *et al*., 2006; Bogler *et al*., 2006). Este trabajo fue posible gracias a la disponibilidad de una colección de *Agaves* (García-Mendoza, 1998) y a la combinación de estudios bioquímicos (Nieto-Sotelo; Lledias; García-Mendoza; Martínez-Hernández *et al*., datos no publicados) y moleculares; estos últimos resultado de la generación de recursos genómicos en *A. tequilana* (Martínez-Hernández *et al*., 2010; Simpson *et al*., 2011; Gross *et al*., 2013).

En los últimos 5 años se han desarrollado varias tecnologías que permitirán obtener una gran cantidad de marcadores nucleares que ayuden a discriminar sin lugar a dudas especies muy cercanas, las cuales combinan el uso de secuenciación de nueva generación [NGS] e información genómica de especies dentro del taxón y taxones relacionados para diseñar sondas específicas de genes nucleares que puedan ser amplificadas de manera masiva mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otros casos se recurre a la secuenciación masiva de transcritos mediante RNA-seq o al uso de los métodos de enriquecimiento por captura de genes específicos mediante sondas de DNA o RNA (Cronn *et al*., 2012; Grover *et al*., 2012; Lemmon *et al*., 2012; Mandel *et al*., 2014).

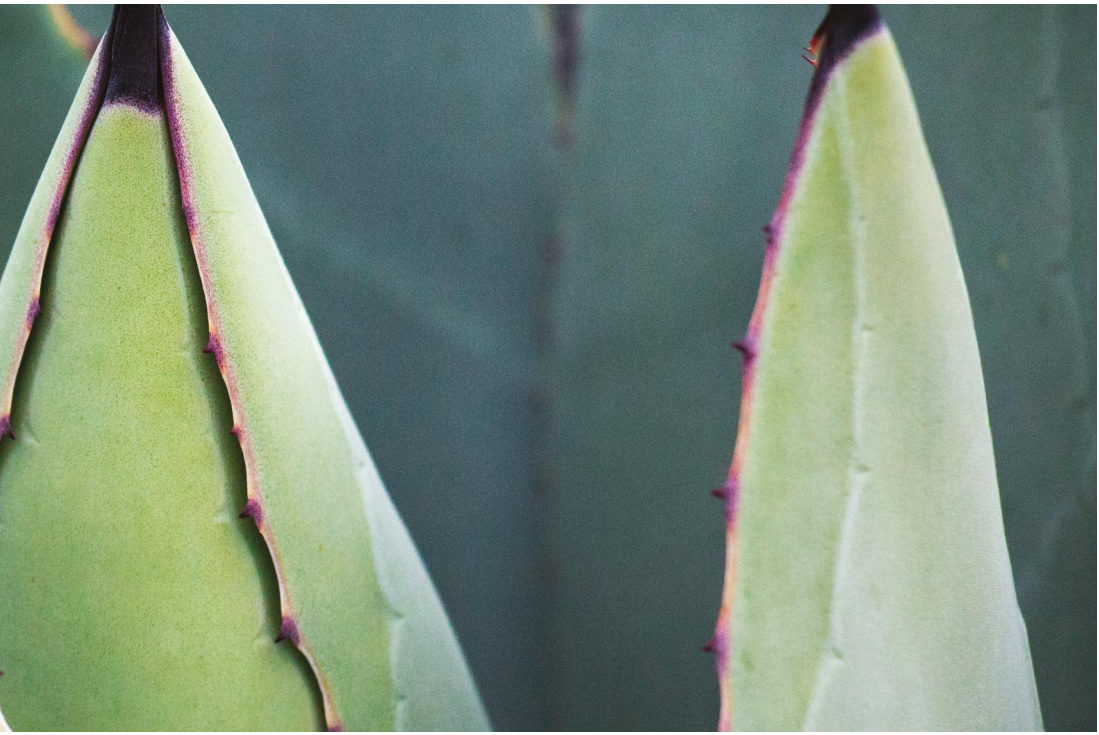
1.4 FISIOLOGÍA DE AGAVES



Agave L. son plantas xerófitas que presentan adaptaciones en su morfología, tales como: hojas suculentas, un sistema de raíces superficial, cutículas gruesas en la epidermis de la hoja, acumulación de ceras en la superficie y metabolismo tipo MAC (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) (Nobel, 1976; Nobel, 1988; Nobel, 1994; Nobel *et al*., 2003; Pimienta et. al., 2005) esto les permite adaptarse a ambientes con temperaturas altas y habitar regiones donde la escasez de agua es una limitante, localizándolas en zonas áridas y semiáridas, laderas, suelos rocosos poco profundos y pobres en nutrientes, zonas costeras, e incluso como epífitas en selvas tropicales (Gentry *et al*., 2004; Good-Ávila *et al*., 2006). Adicionalmente, a las características anteriormente mencionadas, la organización de las hojas en forma de roseta en los agaves, permite captar mayor radiación para el proceso de fotosíntesis y canalizar el agua hacia las raíces superficiales, las cuales en épocas de sequía pueden disminuir de tamaño y así evitar la pérdida de agua mediante este sistema (Nobel 1994; Nobel y Sanderson 1984; Stewart, 2015).

» *Adaptaciones al estrés por sequía*

Las plantas de agave, evitan daños fisiológicos causados por la sequía a través de la asimilación nocturna de CO_2, cutículas gruesas, baja frecuencia de estomas y suculencia en las hojas. Estas dos últimas adaptaciones



Agave parryi
Arizona, Nuevo México, Chihuahua, Durango, Guanajuato. Fibras y ornamental.

permiten el movimiento continuo de agua almacenada del parénquima medular al clorénquima durante los periodos de sequía (Pimienta-Barrios *et al*., 2005; Pimienta-Barrios *et al*., 2006), confiriendo la capacidad de soportar periodos prolongados en sequia (> 7 años) (Matiz *et al*., 2013; Stewart, 2015). En muchas especies de *Agave* se ha reportado la apertura de sus estomas en la noche, favoreciendo la captura de CO_2 y minimizando la perdida de agua por transpiración (Holtum y Winter, 2014; Pimienta-Barrios *et al*., 2001). Un parámetro fisiológico ampliamente estudiado, es la asimilación de CO_2, relacionado indirectamente con la fotosíntesis. Existen reportes que indican que el intercambio de CO_2, puede ser afectado por factores como la temperatura, la sequía y en condiciones enriquecidas de CO_2 (Neales *et al*., 1975; Marcelle, 2012; Winter *et al*., 2014). Por último es importante mencionar, que el estrés por sequía, también puede afectar algunas características cuantitativas en los agaves.

El análisis de crecimiento, la distribución de la biomasa, el grosor foliar y el contenido de prolina en 6 especies de *Agave* L. (*A. americana* var. *marginata*, *A. angustifolia* subsp. *tequilana, A. asperrima, A. cupreat*a, *A. durangensis* y *A. salmiana*), se afectaron en condiciones de potencial hídrico (Ψ) de -0.7 a -3.5 MPa. A menor disponibilidad de humedad (-3.5 MPa), se presentó la inhibición de biomasa, en las especies analizadas. Sin embargo, el número de hojas y la cobertura de la planta se mantuvo en las especies de *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, *A. duranguensis*, *A. lechuguilla* y *A. salmiana*, que son especies exitosas adaptativamente en regiones geográficas con escasez de agua. La modificación de la distribución de la biomasa y el incremento del contenido de prolina, como formas de tolerar la restricción de humedad, fue variable entre las especies, demostrando que cada especie de *Agave* L. presentan respuestas fisiológicas y bioquímicas variadas, que reflejan su amplia tolerancia a condiciones ambientales (Ramírez-Tobías *et al*., 2014).

» *Adaptaciones al estrés por temperatura*

Respecto de la temperatura, en los agaves se ha demostrado que las bajas temperaturas (20-25°C) favorecen la asimilación de CO_2 mientras que temperaturas por encima de 30°C detienen esta asimilación, siendo ésta una respuesta fisiológica característica de las plantas tipo MAC. En *A. tequilana* Weber azul, el mayor valor de asimilación neta diaria de CO_2 fue de 664 mmol m-2 d-1, obtenidos a temperaturas promedio de día y noche de 25°C y 17°C, respectivamente (Pimienta-Barrios *et al*., 2001) mientras que en *A. angustifolia* Haw. se demostró que la asimilación de CO_2 disminuye a temperaturas mayores de 20°C (Holtum y Winter, 2014), indicando que esta temperatura favorece la asimilación de CO_2 en agaves.

Existe evidencia en *A. americana* L. y *A. angustifolia* Haw. que durante periodos de sequía, 98% y 85% de fijación de CO_2, respectivamente para cada especie, se fijó durante las primeras 8 horas de la noche, de manera esperada en plantas super-CAM (Marcelle, 2012; Holtum y Winter, 2014). Un factor que ha demostrado estimular la fijación de CO_2 en agaves durante la noche, son las condiciones enriquecidas con CO_2 (800 ppm). Experimentos realizados en *A. angustifolia* Haw. demostraron que en condiciones enriquecidas de 800 ppm, la fijación del CO_2 incrementa en 62%, en comparación con los valores obtenidos en condiciones enriquecidas con CO_2 a 200 y 400 ppm (Winter, 2014). Adicionalmente, las especies de *A. deserti* Engelm y *A. tequilana* Weber azul reducen su conductividad hídrica (K_h) en 50 %, bajo condiciones de Ψ de -2.37 MPa para *A. deserti* Engelm y -1.72 MPa para *A. tequilana* Weber azul, en periodos de 2-12 horas a 35°C.

Posteriormente a 100 días de sequía, la transpiración fue de 41% y 81%, para estas especies de *Agave* L., reflejando potenciales hídricos de -1.96 MPa y -3.42 MPa, respectivamente. Las diferencias encontradas en potencial hídrico y conductividad entre estas especies, es probablemente debida a la cavitación del xilema y a algunas características morfológicas de la hoja de cada especie de *Agave* (Linton y Nobel, 2001).

1.5 MICROPROPAGACIÓN

El cambio climático global y la extensión de los mercados de algunos productos de agave, como fructanos para diverso uso, el tequila, mezcal y pulque entre otros, han ocasionado un interés creciente en estas plantas en el contexto nacional y global.

El cultivo de células y tejidos vegetales (CTV) de especies del género *Agave* ha sido utilizado con diversos fines desde hace muchos años, tal es el caso de la propagación masiva por medio de proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. También, estos procesos han sido utilizados con fines de almacenamiento y conservación y con fines de mejoramiento genético.

Diversos compuestos "no comunes" han sido utilizados en la optimización de protocolos de micropropagación de agaves.

Con el propósito de abreviar la presente revisión, es importante mencionar que en épocas relativamente recientes se han revisado ampliamente en forma tabular y comprensiva los trabajos realizados con procesos de CTV en el género *Agave*. Rodríguez-Garay *et al*., (1996) y Domínguez-Rosales *et al*., (2008b) reportaron la revisión de trabajos de investigación desde 1989 hasta el año 2007, los cuales incluyeron proliferación de yemas axilares, organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática directa e indirecta en un total de 13 especies. Por otra parte, en el año 2006 M.L. Robert publicó un detallado método que en términos generales se puede utilizar para la micropropagación de cualquier especie de *Agave*, siendo también útil para el inicio de procesos de organogénesis y embriogénesis somática. Desde luego que es necesario adaptar el método para la micropropagación óptima de algunas especies en particular, principalmente con respecto a requerimientos específicos de reguladores de crecimiento y eventualmente de medios basales y condiciones de incubación.

En este contexto, el uso de diversos compuestos "*no comunes*" han sido utilizados en la optimización de protocolos de micropropagación de agaves. Como ejemplos del uso de compuestos no comunes están las meta-toplolinas (Domínguez-Rosales *et al*., 2008b) y el nitroprusiato de sodio (NPS) (Rico-Lemus y Rodríguez-Garay, 2014). Muchos protocolos de micropropagación utilizan la citocinina N6-Bencilaminopurina (BA), la cual es fácil de conseguir además de ser relativamente barata. La conversión de BA a sus glucósidos 9G-BA y 9R-BA ha sido reportada en cultivos *in vitro* de *Spathiphyllum floribundum*, los cuales a su vez podrían estar inhibiendo la formación de raíces, más aún, éstos podrían estar afectando el desarrollo de cloroplastos *in vitro* haciendo más sensitivas a la luz a las plantas micropropagadas durante el proceso de aclimatación (Werbrouck *et al*., 1995). Además, otras formas de citocininas

podrían ser más efectivas en los procesos de proliferación de yemas axilares, tal es el caso de las meta-topolinas (MT) utilizadas como una alternativa del uso de BA (Werbrouck *et al*., 1996) En el caso del género *Agave*, el uso de MT fue reportado con éxito para la micropropagación de *A. obscura*. Por otra parte, el NPS es un donador efectivo de óxido nítrico (ON) el cual ha mostrado efectos positivos en la multiplicación de brotes y regeneración en *Vanilla planifolia* (Tan *et al*., 2013). Otros estudios demostraron un efecto positivo en el enraizamiento de *Cucumis sativus* (Pagnussat *et al*., 2002) y *Solanum lycopersicum* (Correa-Aragunde *et al*., 2006). Resultados preliminares en la micropropagación de *A. tequilana* han mostrado mayor propagación y tamaño de propágulos (Rodríguez-Garay, no publicado) con el uso de NPS en el sistema convencional de propagación.

Por otra parte, aunque no se trata de compuestos *"no comunes"*, los experimentos realizados por Ramírez-Malagón *et al*., (2008) demostraron que un manejo *"no común"* en el protocolo de micropropagación de *A. tequilana* resultó positivo. Ellos encontraron que un pulso temporal de 6.8mM de ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) durante 3 días produjo la mayor cantidad de brotes (8.4) en un periodo de 30 días, comparado con sólo un brote producido durante el mismo periodo sin el pulso de 2,4-D.

La embriogénesis somática (ES) también ha sido propuesta como un sistema de micropropagación en especies de *Agave*; sin embargo, estos protocolos han sido poco utilizados para la producción masiva de plantas y se han utilizado para estudios básicos de biología celular, embriología, transformación y otros procesos de mejoramiento genético. Sólo 7 especies de *Agave* han sido sometidas a estudios de embriogénesis somática. El primer reporte en este género fue la ES directa en *Agave victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al*., 1996) y a partir de 2003 continuaron otros reportes de ES indirecta, esto es mediante la desdiferenciación celular y la posterior inducción y expresión de los embriones somáticos (Fig.1.1): *A. sisalana* (Nikam *et al*., 2003), *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al*., 2003), *A. salmiana* (Flores-Benítes *et al*., 2007), *A. tequilana* (Portillo *et al*., 2007), *A. angustifolia* (Arzate-Fernández y Mejía Franco, 2011), *A. vera-cruz* (Tejavathi *et al*., 2007), *A. tequilana* (Rodríguez-Sahagún *et al*., 2011), y *A. sisalana* (Carneiro *et al*., 2014). La ES directa en *A. fourcroydes* fue obtenida por Monja-Mio y Robert (2013).

La Tabla 1.1 muestra un resumen de trabajos de micropropagación, mayormente proliferación de yemas axilares en diversas especies del género *Agave* realizados en el periodo comprendido entre 2006 y 2015.

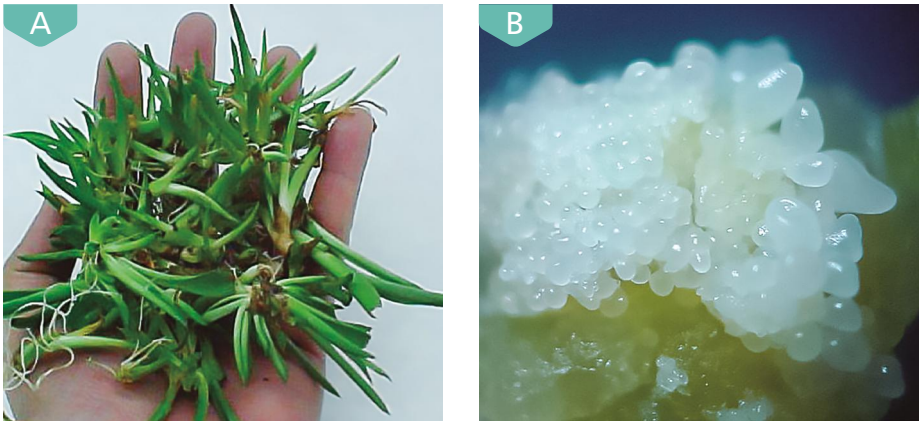


Figura 1.1 Micropropagación de *A. tequilana*. **A)** Proliferación de yemas axilares. **B)** Embriogénesis somática indirecta. Barra en **(A)**=1cm. Barra en **(B)**=1mm.

TABLA 1.1 Trabajos de micropropagación en diversas especies del género *Agave* (2006-2015).

Especie	Explante	Respuesta	Medio Basal+RC mgL^{-1}	Referencia
A. salmiana	Semilla germinada	PYA	MS + 0.04 2,4-D+ 10.0 BA	Puente-Garza, 2015
A. americana	Tallo	PYA	MS + 3.0 BA	Chen *et al.*, 2014
A. americana	Segmentos de hoja	Regeneración de brotes	MS + 2.7 ANA+3.0 BA	Chen *et al.*, 2014
A. americana	Brotes micropropagados	Enraizamiento	0.66 MS + 1.0 AIB	Miguel Luna *et al.*, 2013
A. tequilana	Tallo de hijuelos	PYA	MS + 0.1 AIB + 10.0 KIN	Angeles-Espino *et al.*, 2012
A. fourcroydes	Meristemos de hijuelos	PYA	MS + 0.75 TDZ + 1.0 BA + 1.0 AIB	Garriga Caraballo *et al.*, 2010
A. salmiana subsp. *crassispina*	Brotes micropropagados	PYA	MS + 0.1 AIB + 1.0 BA	Ramírez-Malagón *et al.*, 2008
A. duranguensis	Brotes micropropagados	PYA	MS + 0.001 AIB + 1.0 BA	Ramírez-Malagón *et al.*, 2008

Abreviaciones: **PYA:** Proliferación de Yemas Axilares; **RC:** Reguladores de crecimiento; **2,4-D:** Ácido diclorofenoxiacético; **BA:** Bencilaminopurina; **AIB:** Ácido indolbutírico; **KIN:** Cinetina; **TDZ:** Tidiazurón; **2iP:** 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino) purina; **MT:** Meta-topolina; **OI:** Organogénesis indirecta; **SA:** Sulfato de adenina.

TABLA 1.1 Continuación

Especie	Explante	Respuesta	Medio Basal+RC mgL^{-1}	Referencia
A. obscura	Semilla germinada	PYA	MS + 0.5 AIB + 1.0 BA	Ramírez-Malagón *et al.*, 2008
A. pigmea	Semilla germinada	PYA	MS + 0.1 AIB + 3.0 BA	Ramírez-Malagón *et al.*, 2008
A. victoria-reginae	Semilla germinada	PYA	MS + 0.5 AIB + 0.5 BA	Ramírez-Malagón *et al.*, 2008
A. grijalvensis	Semilla germinada	PYA	MS + 9.0 BA	Sánchez-Urbina *et al.*, 2008
A. cupreata	Semilla germinada	PYA	MS + 1.5 BA	Domínguez Rosales *et al.*, 2008a
A. karwinskii	Semilla germinada	PYA	MS + 1.0 BA	Domínguez Rosales *et al.*, 2008a
A. difformis	Semilla germinada	PYA	MS + 0.2 TDZ	Domínguez Rosales *et al.*, 2008a
A. obscura	Semilla germinada	PYA	MS + 0.2 TDZ	Domínguez Rosales *et al.*, 2008a
A. potatorum	Semilla germinada	PYA	MS + 3.0 KIN	Domínguez Rosales *et al.*, 2008a
A. victoria-reginae	Semilla germinada	PYA	MS + 1.0 2iP	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. peacockii	Semilla germinada	PYA	MS + 1.0 BA	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. salmiana	Semilla germinada	PYA	MS + 0.1 TDZ	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. cupreata	Semilla germinada	PYA	MS + 2.0 BA	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. difformis	Semilla germinada	PYA	MS + 2.0 2iP	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. karwinskii	Semilla germinada	PYA	MS + 1.0 BA	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. obscura	Semilla germinada	PYA	MS + 1.0 MT	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. potatorum	Semilla germinada	PYA	MS + 1.5 KIN	Domínguez Rosales *et al.*, 2008b
A. inaequidens	Secciones de tallo de planta in vivo	PYA	MS + 80.0 SA + 3.0 BA	Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008
A. tequilana	Meristemo de plantúlas prop. *in vitro*	OI	MS + 1.0 ANA (callo) MS + 0.2 2,4-D (OI)	Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006

Abreviaciones: **PYA:** Proliferación de Yemas Axilares; **RC:** Reguladores de crecimiento; **2,4-D:** Ácido diclorofenoxiacético; **BA:** Bencilaminopurina; **AIB:** Ácido indolbutírico; **KIN:** Cinetina; **TDZ:** Tidiazurón; **2iP:** 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino) purina; **MT:** Meta-topolina; **OI:** Organogénesis indirecta; **SA:** Sulfato de adenina.

1.6 MEJORAMIENTO GENÉTICO

Son pocos los programas de mejoramiento genético en especies del género *Agave* que se conocen en el mundo, cuando menos en la literatura. Thomas H. Kearney presidente de la Sociedad Botánica de Washington en 1917 (BSW, 2015) dedicó un homenaje a Louis Trabut médico y botánico francés radicado en Algeria. Entre uno de los grandes merecimientos de Trabut se encuentran los esfuerzos dedicados al mejoramiento de agaves para producción de fibra adaptados a las condiciones de este país, principalmente mediante hibridaciones de sisal con otras especies de *Agave* (Kearney, 1922).

Probablemente, el programa de mejoramiento genético más importante [...] se lleva a cabo en Africa Oriental desde 1931 para el desarrollo de agaves fuertes y resistentes para la producción de fibras

Pocos años después, Rafael Vidal reportó en 1925 sus trabajos y experiencias en el mejoramiento genético con henequén y sisal en los campos experimentales del Departamento de Agricultura de Estados Unidos localizados en Mayaguez, Puerto Rico. Vidal realizó cruzas recíprocas entre sisal y henequén. Los resultados fueron negativos cuando sisal se usó como planta madre, produciendo solamente bulbillos. Por el contrario, henequén produjo semillas y bulbillos, a menudo en el mismo grupo de flores. Este investigador describió las dificultades que representó la altura de los tallos florales de entre 6 y 9 metros para realizar emasculaciones, colecta de polen y las polinizaciones. En virtud de que los tallos florales (quiotes) no son lo suficientemente fuertes, el investigador tuvo que fabricar andamios alrededor de cada planta para realizar el trabajo de hibridación (Vidal, 1925).

Probablemente, el programa de mejoramiento genético más importante y formal es el que se lleva a cabo en Africa Oriental (Amani, Tanzania) desde el año 1931 para el desarrollo de agaves fuertes y resistentes para la producción de fibras (Ikitoo y Khayarallah, 2001). Inicialmente, se introdujeron desde México especies como *A. sisalana*, *A. cantala* y *A. fourcroydes*, realizando cruzas intra-específicas sin éxito alguno. Sin embargo, cruzas inter-específicas resultaron más prometedoras entre *A. angustifolia* x *A. amaniensis*, *A. amaniensis* x *A. angustifolia*, *A. amaniensis* x *A. sisalana* y *A. angustifolia* x *A. sisalana*. La mejor progenie derivó de la cruza *A. amaniensis* x *A. angustifolia* y fue llamada "*Híbrido 11648*", siendo el producto más conocido y utilizado hasta la fecha. El Instituto de Investigación Agrícola Mlingano en Tanzania mantiene una extensa colección de germoplasma con amplia diversidad genética (Ikitoo y Khayarallah, 2001).

Por otra parte, un programa de mejoramiento genético de agaves se desarrolló de 1993 a 2006 en el Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova en La Habana, Cuba (Vinent-Serrano y Fajardo-Gutiérrez, 2009). Nuevamente, se trata de mejoramiento genético de agaves para la producción de fibra. En este programa se desarrollaron accesiones a partir de 5 plantas seleccionadas con pocas espinas en los márgenes de las hojas. Además, se desarrollaron accesiones a partir de segregación de plantas de henequén (*A. fourcroydes*) y finalmente se desarrollaron accesiones a partir de la segregación del Híbrido 11648 desarrollado años antes en el programa de mejoramiento de Tanzania. La selección de segregantes se realizó en base a características como longitud y ancho de la hoja, cantidad de hojas por planta, porcentaje de fibra seca, rendimiento de fibra seca por planta, resistencia tensil de la fibra. De todo el trabajo anterior se reportaron dos accesiones sobresalientes: accesión 97 con mayor longitud de hoja, mayor cantidad de fibra seca por planta y mayor desarrollo vegetativo y la accesión 31-10 llamada finalmente *"Liliana CH"* con los mayores rendimientos de fibra seca y menor número de espinas en los márgenes de las hojas (Vinent-Serrano y Fajardo-Gutiérrez, 2009).

La variación genética producida in vitro [...] representa una oportunidad biotecnológica para realizar mejoramiento genético de Agaves

Respecto del uso de herramientas biotecnológicas destacan algunos reportes relativamente recientes orientados al mejoramiento genético de agaves. Rodríguez-Garay (2011) reportó un sistema mixto en el cual se conjugan protocolos semi-convencionales de hibridación y el rescate *in vitro* de embriones cigóticos. En este sistema la polinización se realiza in casa, en condiciones de laboratorio para eliminar los problemas y riesgos de las hibridaciones reportadas por Vidal (1925) con respecto a la altura de los tallos florales (quiotes). Posterior a la polinización el desarrollo del fruto se lleva a cabo sobre las mesas del laboratorio hasta el momento oportuno para realizar el rescate de los embriones cigóticos y continuar su desarrollo y multiplicación *in vitro*. De esta manera se puede tener un buen número de copias de cada genotipo resultante de una fecundación con propósitos de evaluación posterior. Así, un buen número de híbridos interespecífios se encuentran actualmente en evaluación de campo.

Otro de los avances importantes es el desarrollo de protocolos efectivos para la transformación de agaves. El primer reporte de transformación fue en *A. tequilana* (Santacruz-Ruvalcaba, 2001). Los objetivos del trabajo fueron establecer

un protocolo de bombardeo de genes en callos embriogénicos de *A. tequilana* Weber var. azul (Sistema PDS-1000/He de BIO RAD), evaluar la expresión transitoria de diferentes plásmidos insertados mediante biobalística en callos embriogénicos; establecer un sistema de selección celular para identificar las células transformadas; obtener clonas y plantas transgénicas; evaluar fenotípicamente la expresión de los genes introducidos y demostrar la integración y expresión estable de los genes insertados en el genoma. Finalmente, se obtuvieron 7 clones de plantas resistentes al herbicida glufosinato de amonio.

Posteriormente, en el año 2007 se reportó la transformación genética de *A. salmiana* mediante el uso de dos protocolos diferentes: *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo de partículas (Flores-Benítez, 2007). El gene *uid*A (ß-glucuronidasa) fue utilizado como gene reportero para ambos métodos y los genes *npt*II y bar fueron utilizados como genes para selección para *A. tumefaciens* y biolística respectivamente. La transformación fue detectada positivamente por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en plantas de con una edad de 11 meses y también confirmando con ensayos histoquímicos con ß-glucoronidasa (GUS).

Por otra parte, la enfermedad llamada *"Zebra"* causada por *Phytophtora nicotianae* es un serio peligro que ataca al Híbrido 11648 en todas las regiones del mundo donde se cultiva para la producción de fibra. Recientemente, se reportó el éxito en la transformación de este híbrido con el gene *"hevein"* de *Pharbitis nil* (una clase de *Morning Glory*). La integración y expresión de este gene en el genoma del híbrido fueron analizadas por medio de hibridación Southern y PCR reversa. La resistencia a *P. nicotianae* de las plantas del Híbrido 11648 transgénico fue incrementada (Gao *et al*., 2014).

Otro trabajo orientado al mejoramiento genético es el reportado por Ruvalcaba-Ruiz *et al*., (2012) en el cual fue posible la producción de plantas trisómicas (2n+1) de *A. tequilana* mediante la adición de diversas concentraciones de *para*-fluorophenylalanine al medio de cultivo para inducción de células embriogénicas. Actualmente, se encuentran en crecimiento dos plantas trisómicas en los jardines del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (Guadalajara, Jalisco. México) y dos más en invernadero.

Finalmente, la variación genética producida *in vitro*, espontánea o inducida representa una oportunidad biotecnológica para realizar mejoramiento genético de agaves por medio de selección celular. Pre-requisito importante para estas metodologías son los protocolos de embriogénesis somática indirecta. Rodríguez-Garay *et al*., (2015) describen varios ejemplos en *A. tequilana* en los que se lograron individuos resistentes a *Erwinia carotovora* y a *Fusarium oxysporum.*

1.7 CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA, CROMOSOMAS Y CITOMETRÍA DE FLUJO

El uso de la citometría de flujo (CF) ofrece alternativas para determinar el tamaño del genoma, su composición en millones de pares de bases de nucleótidos (Mpb) y el nivel de poliploidía en especies y variedades de especies vegetales (Dolezel *et al*., 2007 a). La determinación de sus cariotipos proporciona información del número básico (x) de grupos de ligamiento génico, aportando un indicador de la similitud genética entre poblaciones y especies; las especies de *Agave* presentan un número básico x=30 (Moreno-Salazar *et al*., 2007; Palomino *et al*., 2008; 2010, 2012, 2015). El análisis de estos parámetros sumado a los de CF, permite conocer la identidad de los genomas de estas especies y evaluar las variaciones intra e inter-específicas (citotipos) entre ellas. Los cambios en sus cariotipos pueden deberse a variaciones en la estructura de sus cromosomas por rearreglos estructurales en sus cromosomas o mutaciones puntuales a nivel inter o intra-específico, favoreciendo procesos de especiación en estas especies (Gómez-Rodríguez *et al*., 2013; Moreno-Salazar *et al*., 2007; Palomino *et al*., 2007; 2008, 2010, 2012, 2015).

Todas las poblaciones de especies y variedades de *Agave* descritas y analizadas en este trabajo y en otras especies reportadas en la literatura, muestran un cariotipo bimodal formado por un grupo de cromosomas grandes y 25 pequeños. Los cariotipos bimodales se mantiene en las plantas de agave diploides, donde cada grupo de cromosomas está formado por 2 cromosomas y en los poliploides se presentan 3, 4 o más, en cada grupo de cromosomas, relacionado con el nivel de poliploidía analizado.

Las variaciones en el tipo de sus cromosomas pueden observarse en poblaciones de variedades y especies de *Agave*, definiendo *"citotipos estructurales"* en el mismo nivel de poliploidía (Palomino *et al*., 2012; Gómez-Rodríguez *et al*., 2013). Las especies de *Agave* muestran niveles de ploidía, desde diploides (2x) hasta octoploides (8x), aunque en estos estudios solamente evidenciamos (6x). Las variaciones de poliploidía en poblaciones de diferentes variedades o especies en *Agave*, determinan citotipos numéricos (Palomino *et al*., 2005; 2007; 2012). Frecuentemente se evidencian ambos mecanismos, en la formación de citotipos en *Agave*. Las distancia entre poblaciones, más las barreras físicas como cerros o vegetación, son factores que impiden el flujo genético entre ellas y causan aislamiento biogeográfico o reproductivo y facilitan las diferencias de las poblaciones debido a deriva genética (Moreno Salazar *et al*., 2007; Palomino *et al*., 2015). Estos estudios ayudan a esclarecer su taxonomía, conocer su biodiversidad, las relaciones filogenéticas entre taxa y para establecer proyectos de mejoramiento, biotecnología y biología molecular, además de planear estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* (Dolezel *et al*., 2007b).

En las Tablas 1.2 y 1.3, se presentan resultados utilizando la citometría de flujo para determinar el tamaño del genoma, su composición y el nivel de poliploidía en poblaciones de especies de *Agave*, también se analizó la variación de sus cariotipos.

Todas las poblaciones de especies y variedades de *Agave* descritas y analizadas para otras especies reportadas en la literatura muestran un cariotipo bimodal formado por un grupo de cromosomas grandes y 25 pequeños con un número básico x=30. La bimodalidad se mantiene en las plantas poliploides, donde cada grupo de cromosomas está formado por 2 cromosomas en el diploide y 3, 4 o más en cada grupo de cromosomas, de acuerdo al nivel de poliploidía presente en cada individuo (Figuras 1.2 a-b y 1.3 a-b).

El contenido de ADN o tamaño del genoma de las especies y variedades diploides (2n=2x=60) de *Agave*, presentan un tamaño del genoma cercano a 2C ADN=8.0 pg como se observa en poblaciones de *A. angustifolia* de localidades de Oaxaca y Sonora, en *A. angustifolia* var. Cimarrón y Lineño de Jalisco, en *A. cupreata* de Guerrero; *A. parviflora* subsp. *flexiflora* de Sonora; en poblaciones de *A. rodacantha* de Sonora, y en 6 variedades de *A. tequilana*, incluyendo la var. azul. El contenido de ADN de variedades y especies triploides (2n=3x=90), corresponde a alrededor de 2C ADN=12.0 pg como se observa en una población de *A. angustifolia* de Oaxaca y en *A. tequilana* var. bermejo triploide. Las especies o variedades tetraploides (2n=4x=120) de *Agave* presentan un tamaño de genoma cercana a 2C ADN=16.0 pg como de observó en una población de *A. cupreata* de Guerrero y en *A. tequilana* var. chato tetraploide. El contenido de ADN de especies o variedades de *Agave* pentaploide (2n=5x=150) corresponden a un valor alrededor de 2C ADN=20.0 pg como *A. cupreata* de Guerrero y *A. tequilana* var. chato pentaploide de Jalisco (Tablas 1.2 y 1.3). Solamente se determinó una población hexaploide (2n=6x=180) con un valor alrededor de 2C ADN=24.0 pg en *A. cupreata* de Guerrero (Tabla 1.2; Figuras 1.4 a-d).

TABLA 1.2 Contenido de ADN nuclear, tamaño del genoma, niveles de poliploidía y cariotipo en especies y variedades de *Agave*.

Género/ especie/ variedad	Localidad	Nivel de ploidía	Contenido 2C de ADN (pg) $\bar{X} \pm EE$	Tamaño del genoma 1Cx (Mpb)	Fórmula cariotípica
A. angustifolia[2,3]	Teotitlán, Oaxaca	2n= 2x= 60	8.45±0.06	4139	42m+8sm+ 2st+8t
A. angustifolia[3,4]	El Bajío, Sonora	2n= 2x= 60	8.51±0.03	4172	42m+4sm+ 10st+4t
A. angustifolia[3,4]	Los Mochomos, Sonora	2n= 2x= 60	8.49±0.03	4155	48m+2sm+ 6st+4t
A. angustifolia[3,4]	El Chorro, Sonora	2n= 2x= 60	8.51±0.03	4167	48m+2sm+ 6st+4t
A. angustifolia[3,4]	Tlacolula, Oaxaca	2n= 3x= 90	12.42±0.05	4057	60m+12sm+ 6st+12t
A. angustifolia var. cimarron[10]	Tolimán, Jalisco	2n= 2x= 60	8.22± 0.03	4013	42m+4sm+ 6st+8t
A. angustifolia var. lineño[10]	Tolimán, Jalisco	2n= 2x= 60	8.18± 0.01	4002	48m+2sm+ 2st+8t
A. aktites[3,6]	Las Bocas, Sonora	2n= 2x= 60	8.41±0.03	4120	46m+6st+8t
A. aktites[3,6]	San Carlos,Sonora	2n=2x= 60	8.40±0.03	4119	46m+6st+8t
A. cupreata[3,8]	Ayahualco, Guerrero	2n= 2x= 60	7.85±0.04	3840	42m+6sm+ 4st+8t
A. cupreata[3,8]	Mazatlan, Guerrero	2n= 2x= 60	7.89±0.03	3857	38m+8sm+ 6st+8t
A. cupreata[3,8]	Miraval, Guerrero	2n= 2x= 60	7.90±0.04	3864	42m+2sm+ 8st+8t
A. cupreata[3,8]	Xochapa, Guerrero	2n= 4x= 120	16.54±0.08	4043	84m+4sm+ 16st+16t
A. cupreata[3,8]	Xochapa, Guerrero	2n= 5x= 150	20.42±0.25	3995	105m+5sm+ 20st+20t

Mpb= Millones de pares de bases de nucleótidos del grupo de cromosomas monoploides, 1Cx (14). Los números citados en la primera columna, corresponden a los cariotipos de especies y variedades de *Agave* que se publicaron en la referencia correspondiente.

TABLA 1.3 Contenido de ADN nuclear, tamaño del genoma, niveles de poliploidía y cariotipo en especies y variedades de *Agave*.

Género/ especie/ variedad	Localidad	Nivel de ploidía	Contenido 2C de ADN (pg) $\bar{X}$ ±EE	Tamaño del genoma 1Cx (Mpb)	Fórmula cariotípica
A. rhodacantha[3,4]	El Bajío, Sonora	2n= 2x= 60	8.50±0.09	4167	40m+6sm+ 4st+10t
A. rhodacantha[3,4]	Los Mochomos, Sonora	2n= 2x= 60	8.33±0.04	4080	40m+6sm+ 4st+10t
A. tequilana var. lineño[1, 5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.30±0.05	4007	42m+4sm+ 8st+6t
A. tequilana var. azul listado[1, 5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.39±0.05	4047	42m+6sm+ 4st+8t
A. tequilana var. azul[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.39±0.02	4048	42m+ 12st+6t
A. tequilana var. azul[7]	Trisómico, *in vitro*	2n= 2x+1= 61	8.64±0.03	4223	42m+ 12st+7t
A. tequilana var. moraleño[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.41±0.06	4057	18m+20sm+ 16st+6t
A. tequilana var. xiguin[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.42±0.05	4061	48m+2sm+ 4st+6t
A. tequilana var. pata de mula[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 2x= 60	8.52±0.07	4109	48m+ 2st+10t
A. tequilana var. bermejo[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	2n= 3x= 90	12.51±0.05	4025	66m+ 3sm+21st
A. tequilana var. chato[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	4n= 4x= 120	16.02±0.05	3864	88m+8sm+ 16st+8t
A. tequilana var. chato[1,5]	Tequila, Los Altos, Jalisco	4n= 5x= 150	20.11±0.09	3881	No se analizó

Mpb= Millones de pares de bases de nucleótidos del grupo de cromosomas monoploides, 1Cx (14). Los números citados en la primera columna, corresponden a los cariotipos de especies y variedades de *Agave* que se publicaron en la referencia correspondiente.

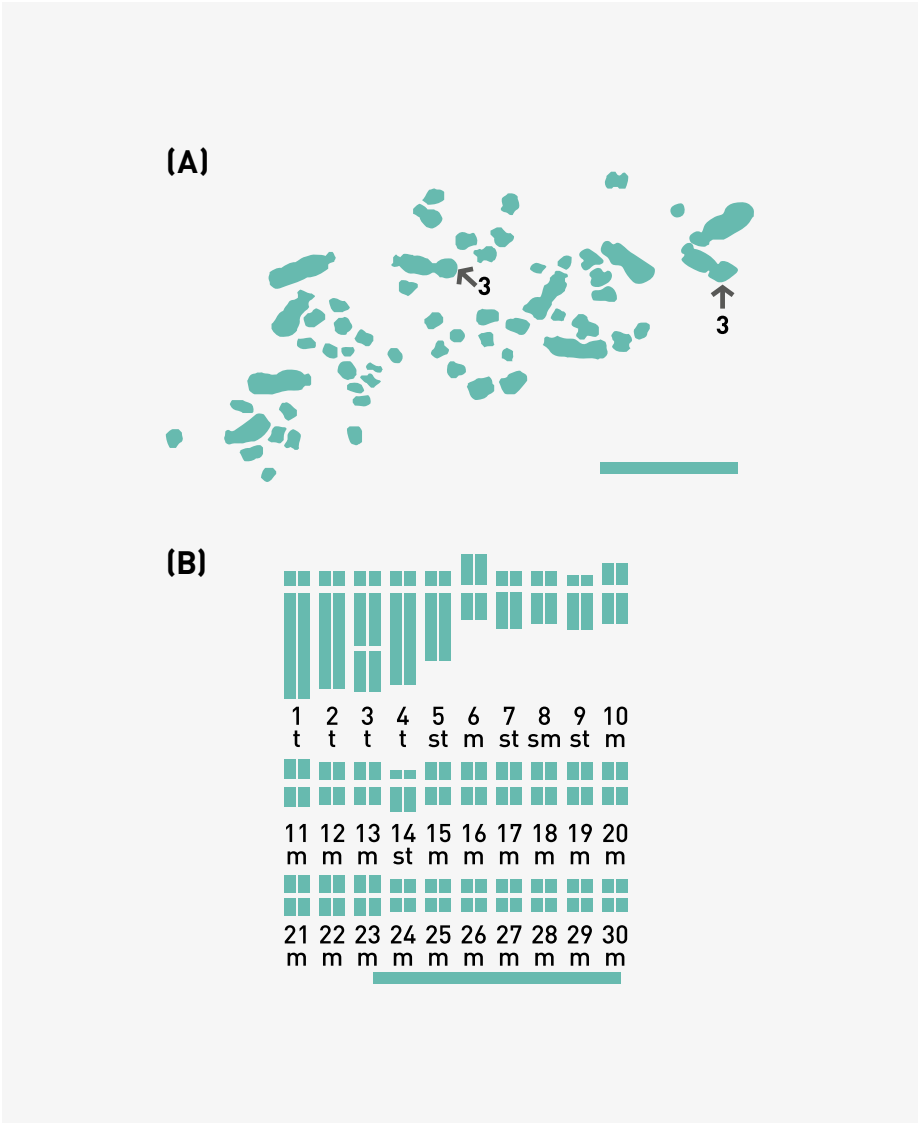


Figura 1.2 Cromosomas de célula diploide de *Agave cupreata* (2n=2x=60) de la localidad de Miraval 573: (A) célula metafásica (B) idiograma. Números 3 y flechas indican los cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos. t=cromosomas telocéntricos, st=cromosomas subtelocéntricos, sm=cromosomas submetacéntricos y m=cromosomas metacéntricos. La barra equivale a 10 μm.

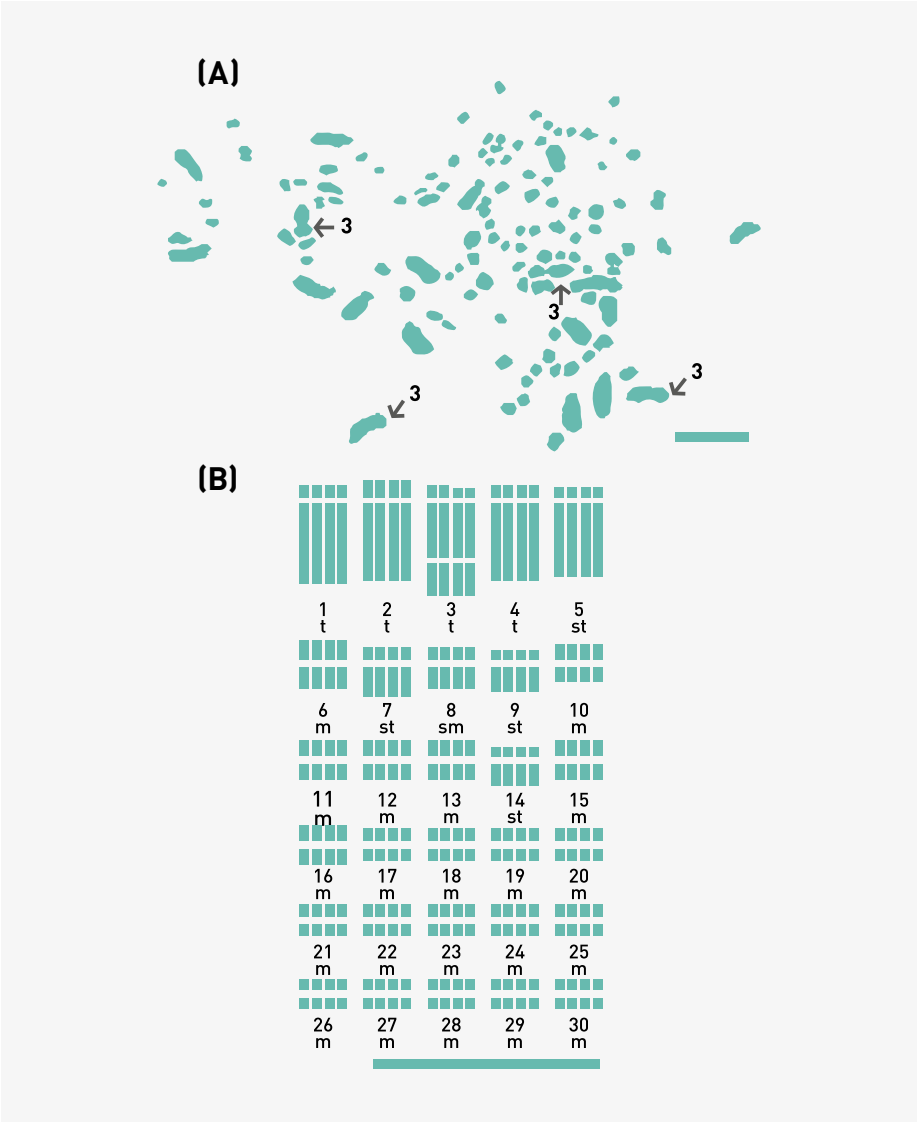


Figura 1.3 Cromosomas de célula tetraploide (2n=4x=120) de *Agave cupreata* de la localidad de Xochapa 571: (A) célula metafásica (B) idiograma. Números 3 y flechas indican los cromosomas homólogos con constricciones secundarias en los brazos largos. T=cromosomas telocéntricos, st=cromosomas subtelocéntricos, sm=cromosomas submetacéntricos y m=cromosomas metacéntricos. La barra equivale a 10 μm.

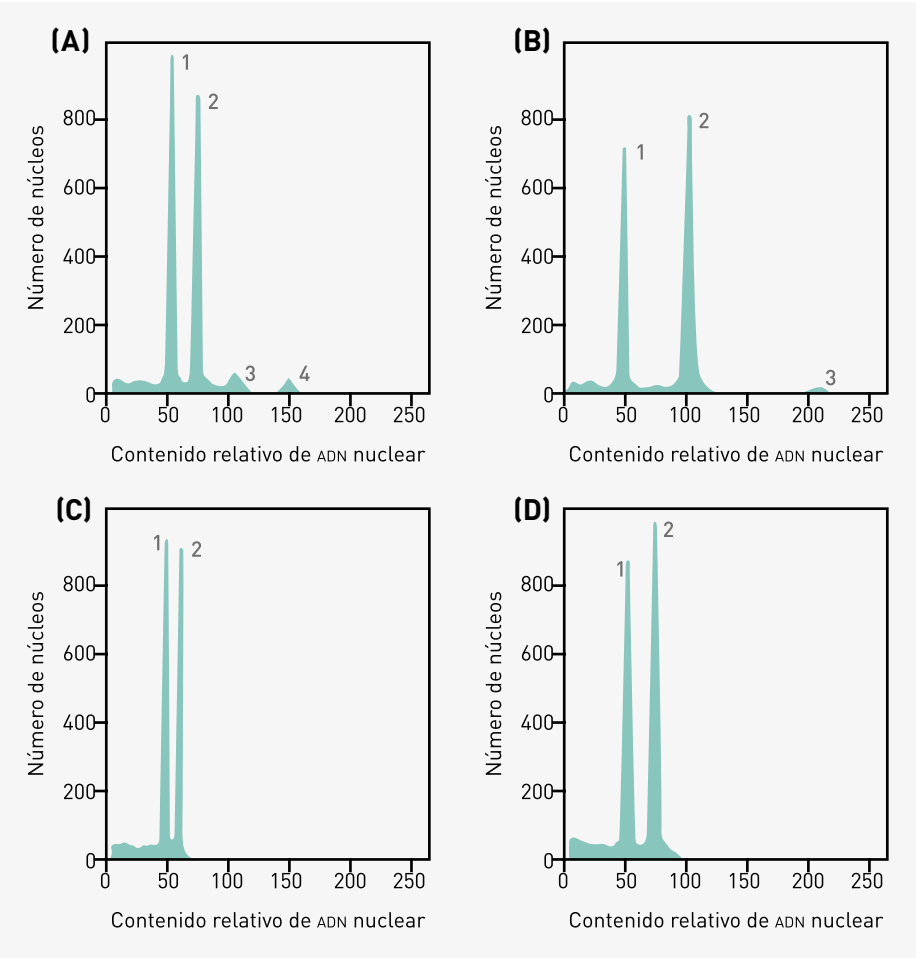


Figura 1.4 Estimación del contenido de ADN nuclear en *Agave cupreata* usando citometría de flujo (A) Análisis simultaneo de núcleos aislados de *A. cupreata* diploide con 2n=2x= 60) y Zea mays cv. CE-777. Los picos 1 y 3 representan G1 y G2 de núcleos de Z mays. Los picos 2 y 4 representan G1 y G2 de *A. cupreata*. (B) Análisis simultaneo de núcleos aislados de *A. cupreata* tetraploide (2n=4x=120) y de *A. cupreata* diploide, el cual fue usado como testigo interno de *A. cupreata* tetraploide. El pico 1 representa núcleos G1 de *A. cupreata* diploide. Los picos 2 y 3 representan G1 y G2 de *A. cupreata* tetraploide. (C) Análisis simultaneo de núcleos aislados de *A. cupreta* pentaploide (2n=5x=150); *A. cupreata* tetraploide fue usado como testigo interno. El pico 1 representan núcleos G1 *A. cupreata* tetraploide. El pico 2 representa nucleos G1 de *A. cupreata* pentaploide. (D) Análisis simultaneo de núcleos aislados de *A. cupreata* hexaploide (2n=6x=180); *A. cupreata* tetraploide fue usado como testigo interno. El pico 1 representa núcleos G1 de *A. cupreata* tetraploide. El pico 2 representa núcleos G1 de *A. cupreata* hexaploide.

1.8 ECOLOGÍA MICROBIANA DEL AGAVE: PERSPECTIVAS Y BACTERIAS ENDÓFITAS

El estudio en años recientes va en función de la ecología y fisiología que guardan algunas especies de *Agave* en distintas regiones del norte y centro de México, así como en la importancia económica de los géneros de los cuales puede obtenerse alcohol para biocombustibles y en la producción de bebidas espirituosas, sumado a la producción de oligofructanos, una industria que viene creciendo.

Debido a su excepcional capacidad para prosperar en zonas áridas, ambientes calientes y suelos con nutrientes mínimos como el nitrógeno, el estudio de la ecología microbiana ("microbiomas") asociadas a las especies de *Agave* ha adquirido importancia, ya que explican el comportamiento de las mismas en la geografía de los diversos ecosistemas que habitan. Los microbiomas son el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, etc.) que colonizan interna y superficialmente a sus hospedantes. Actualmente hay un gran interés científico en los microorganismos endófitos, cada día aparecen publicaciones nuevas sobre las bondades (beneficios) de estos microbios que son parte del microbioma activo, que habitan los tejidos internos y en muchos casos se asocian con la estimulación del crecimiento, control de patógenos y factores abióticos, así como en la asimilación de nutrientes orgánicos e inorgánicos que en conjunto con los microorganismos de las rizósfera apoyan la nutrición y transferencia de materiales del suelo a la planta. Sin embargo los mecanismos moleculares que regulan la interacción con el hospedante son totalmente desconocidos.

Las publicaciones de los microorganismos benéficos asociados al agave es relativamente pobre en número, siendo más numerosos los hallazgos reportados para bacterias y hongos patógenos. Haciendo un breve recuento en 1953 Sánchez-Marroquín (1967), investigador mexicano describe por primera vez estudios de la microbiología del pulque, fermento obtenido de algunas especies de *Agave* (*A. salmiana, A. mapisaga, A. atrovirens, A. ferox, A. hookori* y *A. americana*), señalando a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* como la causante del sabor característico y consistencia viscosa que presenta la bebida. Años siguientes se encontró que la diversidad bacteriana del aguamiel usada en la preparación del pulque está compuesta por bacterias ácido lácticas como *L. mesenteroides, L. kimchi* y *L. citreum* (Escalante *et al*., 2008). Hoy se conoce ampliamente que *L. mesenteroides* secreta enzimas especializadas que catalizan la polimerización de fructosa a levano quien da la consistencia al pulque (Olivares-Illana *et al*., 2003; Chellapandian *et al*., 1998; Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008). Sin embargo, recientemente se reveló por primera vez a *L. mesenteroide*s como una bacteria endófito de *Agave*. En el mismo estudio se publica los primeros resultados sobre microorganismos endófitos cultivables en plantas comerciales de agave (*A. tequilana* Weber var. azul) evaluando el potencial agronómico de los mismos, así como el efecto antifúngico de algunos grupos característicos. Se hallaron 7 grupos de bacterias que incluyen a *Acinetobacter, Cronobacter, Enterobacter, Bacillus, Klebsiella, Pseudomonas, Enteroccocus* y *Gluconobacter* (Martinez-Rodriguez *et*

al., 2014). Las propiedades agronómicas de estos grupos microbianos los vuelven particularmente importantes para su reintegración en aquellas plantas que se producen por técnicas de micropropagación, ya que en el proceso del cultivo celular éstos son eliminados, y se convierten en excelentes candidatos para ser bio-inoculantes. Investigaciones han mostrado desde un enfoque metagenómico la existencia de comunidades microbianas diazotrópicas asociadas con algunos agaves nativos y *A. tequilana*. La bacterias dominantes pertenecen a los siguientes filos: proteobacterias, actinobacterias y acidobacterias y su diversidad se modifica por la sequía y el tejido que colonizan (Desgarennes *et al*., 2014). Recientemente (Coleman-Derr *et al*., 2015), sugieren la existencia de una diferencia significativa en la diversidad microbiana en *A. tequilana* cultivado de forma comercial comparada con agaves nativos como *A. salmiana* y *A. deserti*, y además muestra que tanto la endosfera de la raíz y de las hojas contienen géneros microbianos diferentes a los agaves nativos. Se observó que *Stenotrophomas* y *Agrobacterium* son mayoritariamente en la raíz y *Acinetobacter* y *Bacillus* en la endosfera de las hojas.

Se han enfocado investigaciones en la interacción simbiótica de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y actinobacterias de la rizósfera de *A. cupreata* del estado de Michoacán, principal cultivo para la producción del mezcal. En Michoacán 29 municipios se dedican a la producción del mezcal y recientemente esta región mezcalera obtuvo la Denominación de Origen (DOM) empleando *A. cupreata* como materia prima. Los resultados que se tienen son dos colecciones de HMA y una de actinomicetos: 14 consorcios micorrízicos en total aislados de suelo rizosférico; 8 de agave mezcalero y 6 de agave tequilero respectivamente. Los HMA aislados y propagados perteneces a 10 familias, la colección de actinobacterias comprende 80 aislados, abarcando diversos géneros (datos no publicados); estas colecciones han sido evaluadas como promotores de crecimiento y bioprotectores en *A. tequilana* y *A. cupreata* mostrando un potencial efecto bioprotector sobre la marchitez del agave por *Fusarium oxysporum*, aunado con el efecto de promotor de crecimiento impacto importante en el cultivo de estas especies. Otra especie de *Agave* de gran interés comercial sin duda es *A. angustiofolia* Haw. (maguey espadín) en el estado de Oaxaca; la investigación señala 9 cepas bacterianas endófitas aisladas de la rizósfera que fueron probadas con efecto potenciales de solubilización de fosfatos sobre el crecimiento de las plantas de maguey espadín cultivadas en suelos esterilizados deficientes en fósforo de tres sitios donde se cultiva el maguey. En todos los tratamientos con las bacterias, la disponibilidad del fósforo en la cosecha fue superior a los niveles previos a la plantación (Bautista-Cruz *et al*., 2015). De igual manera se han realizado trabajos para entender los procesos de transferencia de nitrógeno orgánico en las plantas usando como modelo *A.tequilana* y su endófito trasmitido por la semilla *Bacillus tequilensis*. Ha propuesto que los agaves y otras plantas del desierto o que crecen en ambientes nutricionalmente pobres, utilizan a sus propios endófitos como fuente de nutrientes bajo limitaciones de nitrógeno y donde las especies de oxígeno reactivas participan en la degradación de las bacterias (Beltrán-García *et al*., 2014).

1.9 MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LAS PLANTAS DE AGAVE, MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS Y ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO

Las comunidades microbianas asociadas a las plantas tienen papeles muy importantes para mantener la supervivencia de las especies que allí habitan. Sin embargo, se conoce poco acerca de las asociaciones de estas plantas con los microrganismos tanto a nivel de los microrganismos endobiontes, epibiontes, patógenos y asociados a su rizósfera, quedando pendiente, cómo éstos influencian su supervivencia, desarrollo y adaptación a las condiciones estresantes y cambiantes en las que estas plantas se desarrollan. También ha sido reportada la descripción de diversas especies de *Colletotrichum* asociadas a estas plantas de agave; aún queda por analizar su potencial patogénico (Farr *et al*., 2006). En el nivel de bacterias, se han reportado asociaciones endosimbióticas en diferentes tejidos de *A. tequilana*, específicamente con *Bacillus tequilensis*, misma que parece estar involucrada con la transferencia de nitrógeno hacia la planta en condiciones estresantes (Beltran-García *et al*., 2014), probablemente porque los suelos donde se desarrollan estas plantas están caracterizados por su bajo contenido de nitrógeno. Lo anterior, también ha sido observado a través del análisis metagenómico utilizando la estrategia de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) en las comunidades bacterianas asociadas al suelo, episfera y endósfera de dos especies de *Agave* (*A. tequilana* y *A. salmiana*). Este análisis permitió observar cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, principalmente compuestas por Proteobacteria (γ y α), Actinobacteria, y Acidobacteria, de acuerdo al área de muestreo y estación de estudio, finalmente observándose una comunidad predominante de bacterias diazotrophicas (Desgarennes *et al*., 201). Una de las conclusiones más importantes de este último estudio es que grupos específicos de bacterias pueden ser influencias por la estructura de la comunidad microbiana presente. Además de microorganismos, también es posible encontrar insectos que causan daños a los cultivos de agave como el picudo *Scyphophorus acupunctatus* y los barrenadores.

Las comunidades microbianas asociadas a las plantas tienen papeles muy importantes para mantener la supervivencia de las especies que allí habitan

Una estrategia para el manejo de enfermedades en agaves podría ser el control biológico, el cual se define como la disminución de las poblaciones de patógenos por medio de otros organismos; proceso que frecuentemente ocurre en la naturaleza y cuya utilización en la agricultura ha ido en aumento. La capacidad natural de los microorganismos de inhibir el

crecimiento o la actividad metabólica de otros organismos, ha sido bien documentada contribuyendo en la protección de diferentes cultivos y sus productos. Esta práctica permite así disminuir el uso de compuestos químicos de síntesis (Whipps, 2001; Duffy, 2003; Spardo y Gullino, 2004; Compat *et al*., 2005).

Una fuente muy útil para el aislamiento de agentes de control biológico con potencial de uso en el manejo de enfermedades son las raíces de las plantas, en donde existen numerosos microorganismos que incrementan el potencial adaptativo de los cultivos y estimulan el crecimiento vegetal. Algunos reportes han sido publicados donde se han caracterizado comunidades de microrganismos, en estas plantas, incluso para evaluar su potencial como agentes de control de enfermedades para cultivos comerciales (Sánchez y Rebolledo, 2010), lo que puede ser útil para el control de enfermedades importantes como la marchitez ocasionada por *Erwinia* sp. y *Fusarium oxysporum* y la pudrición de las raíces causada por un conglomerado de bacterias, que puede ser controlado por bacteriófagos (Quiñones-Aguilar *et al*., 2014). De esta forma, en el nivel de hongos y levaduras, se han reportado 29 cepas de *Trichoderma* asociada a la rizósfera de plantaciones comerciales de *A. tequilana*; estas cepas incluyeron a la especie *T. longibrachiatum*, la cual presentó potencial de biocontrol contra *Thielaviopsis paradoxa*, un agente infeccioso en *A. tequilana* (Sánchez *et al*., 2007). Sin embargo, aún resta realizar estudios de inhibición de patógenos del agave en campo.

Los mecanismos por los cuales operan estos microorganismos son producto de compuestos antimicrobianos que inhiben el desarrollo de los patógenos, competencia por espacio y por nutrientes, activación de los mecanismos de defensa y de la resistencia sistémica inducida en la planta, así como, de la estimulación del crecimiento debido al incremento en la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y aminoácidos (Nogósrka *et al*., 2007; Ongena *et al*., 2007; Singh y Satyanarayana, 2011).

En particular sobre las enfermedades de tipo bacteriano, -en ambas especies de *Agave*-, ocasiona la enfermedad conocida como *"pudrición blanda del cogollo"*. Hasta el año 2004 sólo se encontraba un estudio relacionado con el agente causal de la pudrición blanda en agave tequilero; dicho reporte mostraba a *Erwinia cacticida* como la especie bacteriana causante de la enfermedad (Jiménez-Hidalgo *et al*., 2004), por lo cual a partir de 2008 se inició un trabajo para confirmar la etiología de esta enfermedad en la Denominación de Origen del Tequila (DOT) de Jalisco-Nayarit; posteriormente en 2010 se inició el aislamiento e identificación del agente causal de la pudrición blanda del agave mezcalero de Michoacán (*A. cupreata*). A la par se inició un programa sistemático de aislamiento de bacteriófagos (virus que matan a bacterias) asociados a las bacterias fitopatógenas causantes de la pudrición blanda de los agaves tequilero y mezcalero de Michoacán. Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran la identificación de bacterias fitopatógenas asociadas a la pudrición blanda

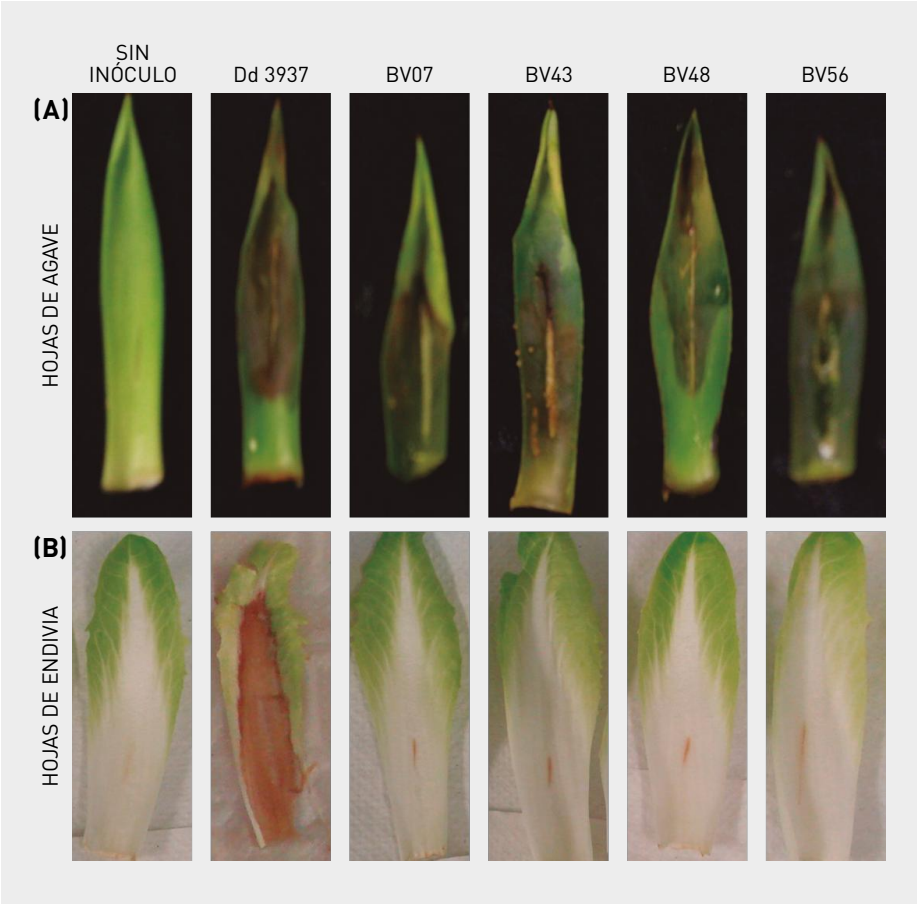


Figura 1.5 Síntomas de pudrición en hojas de agave (A) y endivia (B) de distintas especies de bacterias implicadas en la pudrición blanda de los agaves tequileros y mezcaleros. Inoculación de 20 μL de 107 UFC mL-1; incubación 28°C durante 5 días. Dd 3937=*Dickeya dadantii* cepa 3937; BV07, BV43, BV48, BV56 cepas de los géneros *Bacillus* sp. y *Arthrobacter* sp.

del cogollo del agave; estas bacterias pertenecen a los géneros *Pectobacterium* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp. y *Streptomyces* sp. (Rincón-Enríquez *et al*., 2014), las cuales son capaces de producir los síntomas típicos de la pudrición sólo en agave al ser comparados con otras plantas huésped como la endivia (*Cichorum endivia*) (Fig. 1.5).

Respecto de los bacteriófagos se aislaron y caracterizaron un grupo de aproximadamente 60 aislados distintos (Quiñones-Aguilar *et al*., 2014) (Fig. 1.6), los cuales están en proceso de evaluarse en formulaciones mediante

experimentos a nivel de invernadero y campo con el fin generar tecnología de control biológico de esta enfermedad.

Para el control de la marchitez del agave se han explorado diferentes métodos incluyendo el control biológico. En este marco se incluye el trabajo de García-Vera (2011), en el cual se realizaron aislamientos de hongos filamentosos con potencial como antagonistas de *Fusarium oxysporum* asociado a la marchitez del agave bajo condiciones controladas e *in vitro*. También se ha explorado el efecto de la protección por medio de *Trichoderma harzianum* en experimentos *in vitro* y en invernadero (Qui-Zapata *et al*., 2015). Estos trabajos han mostrado resultados alentadores y positivos que han empezado a replicarse bajo condiciones de campo. Este punto significa un reto importante, al tener condiciones adversas para la mayoría de los microorganismos antagonistas, lo que hace necesario desarrollar nuevas formulaciones y métodos de aplicación diferentes a los utilizados en otros cultivos.

Además del uso de los microorganismos antagonistas, se ha iniciado con generación del conocimiento de la interacción planta/patógeno para conocer los mecanismos que usa la planta para defenderse y los mecanismos de patogénesis del hongo para infectar a la planta (Bahena-Reyes 2014). Este conocimiento puede extrapolarse en el uso de nueva tecnología como son los inductores de defensa vegetal, que han mostrado efectos positivos para el control de *F. oxysporum*, aunque bajo condiciones controladas (Lopez-Velázquez, 2015).

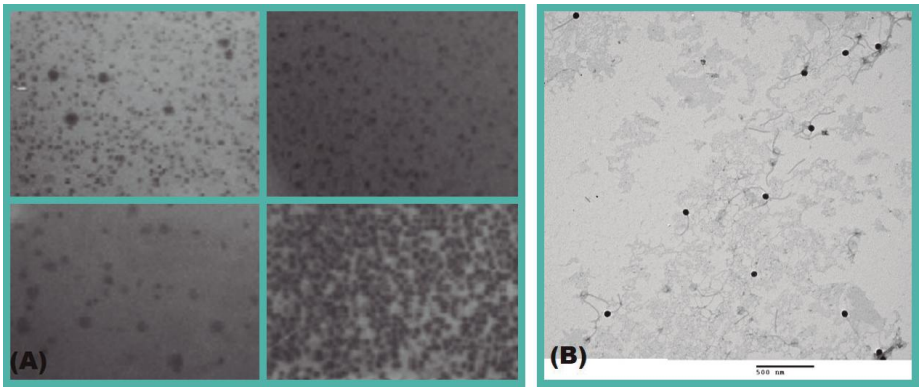


Figura 1.6 Representación de aislados de bacteriófagos asociados a las bacterias fitopatógenas causantes de la pudrición blanda del agave tequilero (*A. tequilana*) o mezcalero (*A. cupreata*). (A) distintas morfologías de placas de lisis típicas de los bacteriófagos. (B) bacteriófagos (señalados con flechas negras) observados en microscopía electrónica (barra=500 nm).

1.10 AGROECOLOGÍA

La agroecología va más allá de entender los procesos ecológicos relacionados con la producción agrícola, tiende a complicar el problema al intentar abordar aspectos del paisaje, la biodiversidad, la sociedad, la cultura y la religiosidad inmersos en una red de interacciones (Altieri y Trujillo, 1987), generando un sistema complejo que se puede llamar agroecosistema. Es así como recursos naturales como el agave toman relevancia, considerando que su aprovechamiento, ya sea cultivado o silvestre, ha sido una práctica antigua que data desde antes de la llegada de los europeos al continente américano y que se realizaba desde el norte de México hasta el sur de América. De acuerdo con las evidencias, el aprovechamiento de esta planta fue una estrategia vital para proporcionar alimento a la población durante prolongados periodos de sequía (Anderies *et al*., 2008), por lo que el agave fue pieza fundamental para el desarrollo y sobrevivencia de los pueblos (Mora-López *et al*., 2011). En este sentido, el agave se hace notar por su importancia económica, social, ambiental (Colunga-GarcíaMarín y May-Pat, 1993) y cultural, ya que es un grupo de plantas que posee múltiples usos que varian dependiendo de la región donde se encuentre, por lo que son relevantes desde el punto de vista agroecológico (García-Herrera *et al*., 2010).

De acuerdo con Colunga-GarcíaMarín y May Pat (1993), en Yucatán hay registrados 40 usos tradicionales del agave, siendo los más importantes el medicinal, la construcción, como utensilio y el textil. Además, son fuente de bebidas con fuerte arraigo e identidad cultural, como el mezcal, el tequila y el pulque, sin considerar que también es forraje y combustible (García-Herrera *et al*., 2010), lo que desde el punto de vista etnobiológico, posiciona a este grupo vegetal dentro de todas las categorías antropocéntricas de uso (Colunga-GarcíaMarín *et al*., 2007). Esto ha generado una simbiosis mutualista entre las especies de *Agave* y las poblaciones humanas. Mora-López *et al.,* (2011) exploran cómo a través del uso tradicional, los agaves pulqueros se han modificado y encontraron diferencias morfológicas en las hojas y la forma de la roseta entre poblaciones de *Agave mapisaga* sujetas a aprovechamiento y poblaciones silvestres de la misma especie.

Detrás de los usos tradicionales que se le dan al agave existe una amplia gama de especies asociadas, por ejemplo Pérez (2007) señala que en la realización del mezcal existe gran diversidad de especies, tanto de agaves como de árboles, microorganismos, aves, insectos y murciélagos promovida por las poblaciones mezcaleras, incluso muchas especies asociadas a estas plantas, se pueden considerar de importancia alimentaria y cultural. García-Hererra *et al*., (2010) mencionan al menos cuatro especies de insectos que realizan su ciclo de vida asociadas a los agaves, como las hormigas, escamoles (*Liometopun apiculatum* y *L. occidentale*), el gusano blanco (*Acentrocneme hesperiaris*) y el gusano de maguey (*Hypopta agavis*),

Agave mezcalero *(A. cupreata)* registrado en el Jardín Botánico de la UNAM. Ciudad de México.

pero hay infinidad de especies. González-Castillo *et al*., (2011), reportaron una gran variedad de artrópodos que habitan en los agaves mezcaleros del norte de México; información que es útil para el desarrollo de estrategias de conservación y manejo, sobre todo si se considera que los artrópodos -y en particular los insectos-, son elementos clave de los ecosistemas, y que con su función ecológica son capaces de regular la funcionalidad de los agroecosistemas.

Dadas las virtudes ambientales y culturales del agave, Bautista y Smit (2012) evaluaron las prácticas sustentables de la producción de agave mezcalero, considerando que el manejo campesino es un factor importante que promueve la diversidad biológica en distintos niveles; lo que encontraron fue que la presión comercial sobre los productores genera actividades productivas intensivas que van en detrimento de la biodiversidad y de los sistemas tradicionales de producción.

1.11 CONCLUSIONES

No existe una filogenia de la familia Asparagaceae que permita delimitar a los géneros que la conforman, especialmente de *Agave*, ya que queda en duda si se incluyen aquí los géneros herbáceos cercanos. Salazar *et al*., (Inédito) han analizado 5 regiones codificantes del cloroplasto (accD, matK, rbcL, rpoB, rpoC1), y un espaciador intergénico del cloroplasto que no codifica (trnH-psbA) y una región nuclear (ITS1/ITS2), los cuales no tienen resolución y no delimitan las especies y los grupos de especies. Por su parte, Ritchie (2014) evaluó la propuesta del Consortium for the Barcode of Life (CBOL) de utilizar las regiones codificantes del cloroplasto MatK y rbcL, para discriminar entre taxones del género *Manfreda*, usando dos métodos de inferencia filogenética (Bayesiano y Máxima parsimonia), encontrando que ninguno apoya el reconocimiento de las especies analizadas.

Independientemente del trabajo con marcadores moleculares, se ha iniciado el trabajo en un *"Atlas de la familia Asparagaceae"*, con toda la información que se recaba en una base de datos de la familia; sin embargo, falta personal que pueda ayudar en el ingreso y análisis de la información.

La caracterización molecular de las Asparagaceaes, así como el conocimiento de sus genomas, serán beneficiados gracias a la combinación de distintos enfoques moleculares con la aplicación de métodos de NGS que permitirán conocer las funciones codificadas por sus genomas y deducir sus relaciones de parentesco. Estos conocimientos facilitarán la identificación de los parientes silvestres de los agaves cultivados, la caracterización de variedades, la identificación de genes asociados a adaptaciones locales, de fragmentos de plantas, de productos biotecnológicos novedosos, de enzimas, etc.

La caracterización molecular de las Asparagaceaes [...] permitirán conocer las funciones codificadas por sus genomas y deducir sus relaciones de parentesco

La suma de adaptaciones morfológicas y fisiológicas a la sequía y temperatura permite a estas plantas adaptarse a una gran variedad de ambientes lo que contribuye a su amplia dispersión (Gentry *et al*., 2004; Good-Ávila *et al*., 2006).

Con base en la literatura revisada existen muchas especies de *Agave* que cuentan con protocolos específicos para la propagación masiva, principalmente por medio de proliferación de yemas axilares, no obstante, es importante señalar que muchos de estos protocolos pueden ser más efectivos en cuanto a tasas de propagación y calidad de las plantas producidas. Para esto se sugiere más investigación en la que se incluyan compuestos *"no comunes"*

con acción hormonal, elementos nutritivos y condiciones ambientales de incubación principalmente la calidad de la luz. Por otra parte, es importante incrementar los trabajos de investigación básica respecto de los procesos de embriogénesis somática, principalmente en especies de interés comercial con propósitos de propagación masiva o para ser usados en el mejoramiento genético.

Según los reportes disponibles, globalmente existe poca actividad de investigación en cuanto al mejoramiento genético de especies de *Agave* de interés económico. En este sentido, se sugiere incluir en estos trabajos investigación básica de la embriogénesis cigótica que facilite el entendimiento de los procesos de desarrollo de la embriogénesis somática que sea útil para aplicar herramientas biotecnológicas como la transformación genética y selección celular entre muchas otras. Es importante señalar también la necesidad de investigación en todos los campos *"omics"* para facilitar todos los procesos de mejoramiento. Con respecto a la producción de líneas transgénicas de agaves, es fundamental la necesidad de detectar o desarrollar fuentes de esterilidad masculina para evitar el flujo de transgenes por medio de polen, dada la alta promiscuidad de este género.

La caracterización del genoma de especies y variedades de *Agave* por su número cromosómico, la estructura de su cariotipo, el nivel de poliploidía y tamaño del genoma por citometría de flujo son útiles en estudios en taxonomía, mejoramiento y biotecnología de especies de *Agave*, consideradas un recurso fitogenético importante en México.

Se abre la oportunidad de estudiar con más profundidad la ecología microbiana de las semillas de primera mano, ya que éstas son vehículos para la transmisión de los endófitos de generación en generación. Así mismo, se requiere tener una base de datos de los microorganismos en los bulbillos e hijuelos derivados del rizoma, y evaluar su impacto en la transferencia de generación para conocer si la pérdida de algunos géneros hace que la planta sea más susceptible a enfermedades y demandante de fertilizantes para su crecimiento.

A la fecha, aún se desconoce el grado de patogenicidad en muchos de los grupos de microrganismos asociados (Gómez-Ortiz *et al*., 2011) e inclusive se continua describiendo nuevas especies de patógenos (Far *et al*., 2006), así como los factores biológicos y ambientales que pueden inducir enfermedades en estas plantas, donde los insectos también juegan un papel importante como vectores o depredadores de la planta (Ibarra, 2001). Resulta importante incursionar en la búsqueda de estrategias de biocontrol para obtener productos amigables con el ambiente para el control de plagas y enfermedades del agave; tema que ha sido poco explorado.

El agave es una planta que se encuentra inmersa en las múltiples dimensiones de la agroecología, sin embargo, la información es difusa y poco clara al respecto, por lo que es necesario profundizar en el estado del arte y generar líneas de investigación multidisciplinarias que aborden a los agaves desde la perspectiva multifactorial de la agroecología.

1.12 REFERENCIAS

Altieri, M. A. & Trujillo, J. (1987). *The agroecology of corn production in Tlaxcala, Mexico.* Human Ecology, 15 (2), 189-220. DOI: 10.1007/BF00888380.

Anderies, J. M., Nelson, B. A. & Kinzing, A. P. (2008). *Analyzing the impact of Agave cultivation on famine risk in arid pre-hispanic northern Mexico.* Human Ecology, 36 (3), 409-422. DOI: 10.1007/s10745-008-9162-9.

Angeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L. & Hurtado-de la Peña, S. (2012). *Micropropagación de Agave (Agave tequilana Weber. var. azul) a través de yemas axilares.* Tropical and Subtropical Agroecosystems, 15, 693-698.

Arzate-Fernández, A. M. & Mejía-Franco, R. (2011). *Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de Agave angustifolia Haw.* Revista Fitotecnia Mexicana, 34 (2), 101-106.

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J. & Peña-Ortega, M. G. (2008, septiembre/diciembre). *Propagación in vitro del "maguey bruto" (Agave inaequidens Koch), una especie amenazada de interés económico.* Revista Chapingo Serie Horticultura, XIV (2), 263-269.

Bahena-Reyes, E. (2014). *La interacción Agave tequilana Weber variedad azul-Fusarium oxysporum. Caracterización de los mecanismos de defensa vegetal.* Acapulco, Guerrero, México: Instituto Tecnológico de Acapulco, 155 pp.

Bautista, J. A. & Smit, M. A. (2012, enero/febrero). *Sustentabilidad y agricultura en la región "del mezcal" de Oaxaca.* Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 3 (1), 5-20.

Bautista-Cruz, A., Martínez-Gallegos, V., Martínez-Martínez, L. & Martínez-Gutiérrez, G. (2015). *Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of Agave angustifolia Haw. (Maguey espadín).* Pakistan Journal of Botany, 47 (3), 1033-1038.

Beltran-Garcia, M. J., White, J. F., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Torres, M. S., Kato, M. J., Medeiros, M. H. & Di Mascio, P. (2014). *Nitrogen acquisition in Agave tequilana from oxidative degradation of endophytic bacteria.* Scientific Reports 4, 6938. DOI: 10.1038/srep06938.

Bogler, D. J. (1995). *Systematics of Dasylirion: Taxonomy and molecular phylogeny.* Boletín de la Sociedad Botánica de México (56), 69-76.

Bogler, D. J. & Simpson, B. B. (1995, abril/junio). *A chloroplast DNA study of the Agavaceae. Systematic Botany*, 20 (2), 191-205. DOI: 10.2307/2419449.

Bogler, D. J. & Simpson, B. B. (1996, septiembre). *Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation*. American Journal of Botany, 83 (9), 1225-1235. DOI: 10.2307/2446206.

Bogler, D. J., Pires, J. C. & Ortega, J. F. (2006). *Phylogeny of Agavaceae based on ndhF, rbcL, and ITS sequences: Implications of molecular data for classifications.* Aliso, 22 (1), 313-328.

Botanical Society of Washington-BSW. (2015). *Presidents of the Botanical Society of Washington.* Consultado el 20 de diciembre de 2015 de: http://www.botsoc.org/BSWPresidents.pdf.

CBOL Plant Working Group. (2009). *A DNA barcode for land plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106 (31), 12794-12797. DOI: 10.1073/pnas.0905845106

Cervantes-Contreras, M. & Pedroza, A. M. (2008). *Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman.* Superficies y Vacío, 21 (3), 1-5. Consultado el 20 de diciembre de 2015 de: http://www.fis.cinvestav.mx/~smcsyv/supyvac/21_1/SV2110108.pdf.

Cházaro-Basañez, M. & Vázquez-García, A. (2013). *Agave jimenoi (Polycehalae group, Asparagaceae), a new species from the Totonocapan region, Veracruz, Mexico.* Phytotaxa, 134 (1), 55-60. DOI: DOI: 10.11646/phytotaxa.134.1.5.

Chellapandian, M., Larios, C., Sánchez-González, M. & López-Munguía, A. (1998). *Production and properties of a dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides IBT-PQ isolated from "pulque" a traditional Aztec alcoholic beverage.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 21 (1), 51-26. DOI: 10.1038/sj.jim.2900560.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. & Leon, C. (2010, 7 de enero). *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species.* Plos One, 5 (1), e8613. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613.

Clary, K. H. & Simpson, B. B. 1995. *Systematics and character evolution of the genus Yucca L. (Agavaceae): Evidence from morphology and molecular analyses.* Boletín de la Sociedad Botánica de México (56), 77-88.

Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P. & Tringe, S. G. (2015, enero). *Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species.* New Phytologist, 209 (2), 798-811. DOI: 10.1111/nph.13697.

Colunga-GarcíaMarín, P. & May-Pat, F. (1993, julio/septiembre). *Agave studies in Yucatan, Mexico. I. Past and present germplasm diversity and uses.* Economyc Botany, 47 (33), 312-327.

Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D. & Martínez-Torres, J. (2007). *Nombres comunes de 102 taxa de Agave reportados por su uso en México como alimento humano, bebida fermentada, bebida destilada fibra o forraje.* En P. Colunga-GarcíaMarín, A. Larqué-Saavedra, L. E. Eguiarte & D. Zizumbo-Villareal (Eds.). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros Agaves* (pp. XIX-XXXVIII). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/ Instituto Nacional de Ecología.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka, E. A. (2005, septiembre). *Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospects*. Applied and Environmental Microbiology, 71 (9), 4951-4959. DOI: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.

Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. & Lamanttina, L. (2006, febrero). *Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato.* Journal of Experimental Botany, 57 (3), 581-588. DOI: 10.1093/jxb/erj045.

Cronn, R., Knaus, J. B., Liston, A., Maughan, J. P., Parks, M., Syring, V. J. & Udall, J. (2012, febrero). *Targeted enrichment strategies for next-generation plant biology.* American Journal of Botany, 99 (2), 291-311. DOI: 10.3732/ajb.1100356.

Dahlgren, R. M. T. & Clifford, H. T. (1982). *The monocotyledons: A comparative study.* Londres, Inglaterra: Academic Press.

Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T. & Yeo, P. F. (1985). *The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy.* Berlín, Alemania: Springer-Verlag, 520 pp.

Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. & Casas, A. (2014). *Vulnerability and risk management of Agave species in the Tehuacán Valley, México.* Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 10, 53-67. DOI: 10.1186/1746-4269-10-53.

Desgarennes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., Peña-Cabriales, J. J. & Partida Martínez, L. P. (2014, diciembre). *Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated Agave species*. FEMS Microbiology Ecology, 90 (3), 844-857. DOI: 10.1111/1574-6941.12438.

Dolezel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. (2007a). *Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry.* Nature Protocols, 2 (9), 2233-2244. DOI: 10.1038/nprot.2007.310.

Dolezel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. (2007b). *Flow cytometry with plants: An overview.* En J. Dolezel, J. Greilhuber & J. Suda (Eds.), *Flow cytometry with plant cells* (pp. 41-65). Weinheim, Alemania: Wiley-VCH.

Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, A., Vasco-Méndez, N. & Pérez Molphe-Balch, E. (2008, octubre/diciembre). *Efecto de citocininas en la propagación in vitro de Agaves mexicanos.* Revista Fitotecnia Mexicana, 31 (4), 317-322.

Domínguez-Rosales, M. S., González-Jiménez, M. L., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Delgadillo-Díaz de León S, Mireles-Ordaz, S. J. & Pérez-Molphe-Balch, E. (2008, mayo/agosto). *El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave*. Investigación y Ciencia, 16 (41), 53-62.

Dos Santos-Carneiro, F., De Oliveira-Domingos-Queiroz, S. R., Rodrigues-Passos, A., Neves-do Nascimento, M. & Souza-dos Santos, K. (2014, julio/septiembre). *Embriogênese somática em Agave sisalana Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração.* Pesquisa Agropecuária Tropical Goiânia, 44 (3), 294-303.

Duffy, B. (2003, septiembre). *Pathogen self-defence: Mechanisms to counteract microbial antagonism.* Annual Review Phytopathology, 41, 501-538. DOI: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606.

Erickson, D. L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L. A. & Kress, W. J. (2008, noviembre). *DNA barcoding in land plants: Developing standards to quantify and maximize success.* Taxon, 57 (4), 1304-1316.

Escalante, A., Giles Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G. & Bolívar, F. (2008). *Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach.* International Journal of Food Microbiology, 124 (2), 126-134. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003.

Escamilla-Treviño, L. (2012, marzo). *Potential of plants from the genus Agave as bioenergy crops.* BioEnergy Research, 5 (1), 1-9. DOI:10.1007/s12155-011-9159-x.

Espinosa, P. H., Arredondo, C., Cano, M. A., Canseco, A. M. & Vázquez, F. (2002, diciembre). *La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño. Catálogo de la diversidad de Agaves.* Folleto Técnico, 2. Oaxaca, México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación/Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias/Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur/ Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, 68 pp.

Farr, D. F., Aime, M. C., Rossman, A. Y. & Palm, M. E. (2006, diciembre). *Species of Colletotrichum on Agavaceae.* Mycological Research, 110 (12), 1395-1408. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.09.001.

Flores-Benítez, S., Jiménez-Bremont, J. F., Rosales-Mendoza, S., Argüello-Astorga, G. R., Castillo-Collazo, R. & Alpuche-Solís, A. G. (2007, diciembre). *Genetic transformation of Agave salmiana by Agrobacterium tumefaciens and particle bombardment.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91 (3), 215-224. DOI: 10.1007/s11240-007-9287-3.

Gao, J., Yang, F., Zhang, S., Li, J., Chen, H., Liu, Q., Zheng, J., Xi, J. & Yi, K. (2014, diciembre). *Expression of a hevein-like gene in transgenic Agave hybrid No.11648 enhances tolerance against zebra stripe disease.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 119 (3), 579-585. DOI: 10.1007/s11240-014-0557-6.

García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J. & Talabera-Magaña, D. (2010). *El género Agave spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica.* Revista Salud Pública y Nutrición (Edición especial, 5), 109-129

García-Mendoza A. (1998). *Con sabor a maguey: guía de la colección de agavaceas y nolináceas del Jardín Botánico*. Instituto de Biología-UNAM. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 114 pp.

García-Mendoza, A. (2002). *Distribution of the genus Agave (Agavaceae) in Mexico.* Cactus and Succulent Journal (74), 177-187.

García-Mendoza, A. (2004). *Agaváceas.* En A. García-Mendoza, M. J. Ordóñez & M. Briones (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 159-169). México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología/Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza/World Wildlife Fund.

García-Mendoza, A. (2010, julio). *Geografía del mezcal.* Artes de México: Mezcal. Arte tradicional (98), 8-15.

García-Mendoza, A. (2011). *Agavaceae.* En R. Medina Lemos (Ed.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* (Fascículo 88). México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología, 95 pp.

García-Mendoza, A. & Chiang, F. (2003, enero). *The confusion of Agave vivipara L. and A. angustifolia Haw., two distinct taxa.* Brittonia, 55 (1), 82-87. DOI: 10.1663/0007-19 6X(2003)055[0082:TCOAVL]2.0.CO;2.

García-Mendoza, A. & Galván, R. (1995, junio). *Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México.* Boletín de la Sociedad Botánica de México (56), 7-24.

García-Ochoa, E. Y., De la Torre-Becerra, N. C., López-Carlos, J., Martínez-Rodríguez, J. C. & García-Beltrán, M. J. (2015, 21 al 26 de junio). *Selección de bacterias endófitas de la semilla del Agave para estudio de diseño de simbiosis y trasferencia de nitrógeno en Agave tequilana.* Memorias XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México.

García-Vera, A. G. (2011). *Evaluación de los hongos filamentosos asociados a la rizósfera de Agave tequilana Weber var. azul con potencial como biofertilizantes y/o agentes de biocontrol contra cepas patogénicas de Fusarium oxysporum.* Tesis de licenciatura no publicada, Universidad de Guadalajara. Zapopán, Jalisco, México, 135 pp.

Garriga-Caraballo, M., González-Oramas, G., Alemán-García, S., Abreu-Cruz, E., Quiroz-Bravo, K., Caligari, P. D. S. & García-González, R. (2010, octubre/diciembre). *Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of Henequen (Agave fourcroydes Lem.).* Chilean Journal of Agricultural Research, 70 (4), 545-551. DOI:10.4067/S0718- 58392010000400003.

Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America.* Tucson, AZ, EE.UU.: University of Arizona Press.

Gentry, H. S. (2004). *Agaves of Continental North America.* Tucson, AZ, EE.UU.: University of Arizona Press, 670 pp.

Gómez-Ortiz, P., Sánchez-Arzipe, A., Virgen-Calleros, G., Carvajal-Cazola, C. R. & Padrón-Corral, E. (2011, mayo/agosto). *Incidencia y severidad de la marchitez del Agave tequilana Weber var. azul en la zona sur del estado de Nayarit, México*. Revista Agraria, nueva época, 8 (2), 21-25.

Gómez-Rodríguez, V. M., Rodríguez-Garay, B., Palomino, G., Martínez, J. & Barba-González, R. (2013). *Physical mapping of 5S and 18S ribosomal DNA in three species*

of Agave (Asparagales, Asparagaceae). Comparative Cytogenetics, 7 (3), 191-203. DOI: 10.3897/CompCytogen.v7i3.5337.

González-Castillo, M., Escalante, M. Q. & Castaño-Meneses, G. (2011). *Arthropods in natural communities in mescal Agave (Agave durangensis Gentry) in an arid zone.* American Journal of Applied Sciences, 8 (10), 933-944. DOI: 10.3844/ajassp.2011.933.944.

Good-Avila, S. V., Souza, V., Gaut, B. S. & Eguiarte, L. E. (2006). *Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae).* Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (4), 9124-9129.

Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z. & Visel, A. (2013). *De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, Agave deserti and Agave tequilana.* BMC Genomics, 14 (1), 563. DOI: 10.1186/1471-2164-14-563.

Grover, C. E., Salmon, A. & Wendel, J. F. (2012, febrero). *Targeted sequence capture as a powerful tool for evolutionary analysis.* American Journal of Botany, 99 (2), 312-319. DOI: 10.3732/ajb.1100323.

Hazra, S. K., Das, S. & Das, A. K. (2002, septiembre). *Sisal plant regeneration via organogenesis.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70 (3), 235-240. DOI: 10.1023/A:1016517617039

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. (2003, 7 de febrero). *Biological identifications through DNA barcodes.* Proceedings of the Royal Society B, 270 (1512), 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hernández, S. L. (1995, enero). *Análisis cladístico de la familia agavaceae.* Boletín de la Sociedad Botánica de México (56), 57-68.

Holtum, J. A. & Winter, K. (2014). *Limited photosynthetic plasticity in the leaf-succulent CAM plant Agave angustifolia grown at different temperatures.* Functional Plant Biology, 41 (8), 843-849. DOI: 10.1071/FP13284.

Ibarra-Nava, M. A. (2001). *Distribución e incidencia de marchitez (Erwinia sp. y Fusarium sp.) del Agave (Agave tequilana Weber), en Los Altos de Jalisco.* Tesis de licenciatura no publicada. Universidad de Guadalajara-Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-División de Ciencias Agronómicas, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México, 39 pp.

Ikitoo, E. C. & Khayarallah, W. A. (Eds.). (2001). *Sisal: Past research results and present production practices in East Africa. Present status, problems, opportunity, and future prospects.* Technical Paper, 8. Viena, Austria: Common Fund for Commodities/United Nations Industrial Development Organization.

Illsley-Granich, C. (2010, julio). *Claves para saborear los saberes del mezcal.* Artes de México: Mezcal. Arte tradicional (98), 16-31.

Jiménez-Hidalgo, I., Virgen-Calleros, G., Martínez-de la Vega, O., Vandemark, G. & Olalde-Portugal, V. (2004, marzo). *Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in Agave tequilana.* European Journal of Plant Pathology, 110 (3), 317-331. DOI: 10.1023/B:EJPP.0000019791.81935.6d.

Kearney, T. H. (1922). *Louis Trabut, botanist and plant breeder.* Journal of Heredity, 13 (4), 153-160.

Kress, W. J. & Erickson, D. L. (Eds.). (2012). *DNA barcodes: Methods and protocols.* Serie Methods in Molecular Biology, 18. Nueva York, EE.UU.: Humana Press, 470 pp.

Kress, W. J., Wurdack J. K., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. (2005, julio). *Use of DNA barcodes to identify flowering plants.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 102 (123), 8369-8374. DOI: 10.1073/pnas.0503123102.

Lemmon, A. R., Emme, S. A. & Lemmon, E. M. (2012). *Anchored hybrid enrichment for massively high-throughput phylogenomics.* Systematic Biology, 61 (5), 727-744. DOI: 10.1093/sysbio/sys049.

Linton, M. J. & Nobel, P. S. (2001, julio). *Hydraulic conductivity, xylem cavitation, and water potential for succulent leaves of Agave deserti and Agave tequilana.* International Journal of Plant Sciences, 162 (4), 747-754. DOI: 10.1086/320782.

López-Velázquez, J. C. (2015). *Efecto del quitosano en los mecanismos de defensa del Agave tequilana Weber var. azul durante la infección de Fusarium oxysporum.* Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Politécnica del Valle de Toluca, México, 80 pp.

Mandel, J. R., Dikow, R. B., Funk, V. A., Masalia, R. R., Staton, S.E., Kozik, A., Michelmore, R. W., Rieseberg, L. H. & Burke, J. M. (2014, febrero). *A target enrichment method for gathering phylogenetic information from hundreds of loci: An example from the Compositae.* Applications in Plant Sciences, 2 (2), 1300085. DOI: 10.3732/apps.1300085.

Marcelle, R. (Ed.). (2012). *Environmental and biological control of photosynthesis.* Proceedings of a conference held at the "Limburgs Universitair Centrum", Diepenbeek, Belgium, 26-30 August 1974. Springer Science & Business Media.

Martínez-Hernández, A., Mena-Espino, M. E., Herrera-Estrella, A. & Martínez, H. P. (2010, abril). *Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en Agaves.* Revista Latinoamericana de Química, 38 (1), 21-44.

Martínez-Palacios, A., Gómez-Sierra, J. M., Sáenz-Romero, C., Pérez-Nasser, N. & Sánchez-Vargas, N. (2011, septiembre). *Diversidad genética de Agave cupreata Trel. & Berger. Consideraciones para su conservación.* Revista Fitotecnia Mexicana, 34 (3), 159-165.

Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, V. M. & Bye, R. (2003, agosto). *Somatic embryogenesis and organogenesis of Agave victoriae-reginae: Considerations for ITS conservation.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74 (2), 135-142. DOI: 10.1023/A:1023933123131.

Martínez-Rodríguez, J. M., De la Mora, M., Plascencia-Correa, L. A., Audelo Regalado, E., Torres-Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E., Peña-Ramírez, Y. J., Escalante, A., Beltrán-García, M. J. & Ogura, T. (2014, diciembre). *Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of Agave tequilana and their role as plant growth promoters.* Brazilian Journal of Microbiology, 45 (4), 13-33. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400025.

Matiz, A., Mioto, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L. & Mercier, H. (2013). *CAM photosynthesis in bromelias and Agaves: What can we learn from these plants?* En Z. Dubinsky (Ed.), *Photosynthesis.* Croacia: Intech. Consultado el 20 de diciembre de 2015 de http://www.intechopen.com DOI: 10.5772/56219.

Miguel-Luna M. E., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., Villegas-Aparicio, Y., Carrillo-Rodríguez, J. C. & Rodríguez-Ortiz G. (2013, agosto/septiembre). *Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave.* Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (Edición especial, 6), 1151-1159.

Monja-Mio K. M. & Robert, M. L. (2013, noviembre). *Direct somatic embryogenesis of Agave fourcroydes Lem. through thin cell layer culture.* In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 49 (5), 541-549. DOI: 10.1007/s11627-013-9535-7.

Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B. & Aguirre-Rivera, J. R. (2011, mayo/junio). *Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género Agave.* Agrociencia, 45 (4), 465-477.

Moreno-Salazar, S. F., Esqueda, M., Martínez, J. & Palomino, G. (2007, enero). *Tamaño del genoma y cariotipo en Agave angustifolia y A. rhodacantha de Sonora, México.* Revista Fitotecnia Mexicana, 30 (1), 13-23.

Nagórska, K., Bikowski, M. & Obuchowski, M. (2007). *Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as a powerful biocontrol agent.* Acta Biochimica Polonica, 54 (3), 495-508.

Neales, T. F. (1975). *The gas exchange patterns of CAM plants.* En R. Marcelle (Ed.), *Environmental and biological control of photosynthesis. Proceedings of a conference held at the "Limburgs Universitair Centrum"*, Diepenbeek, Belgium, 26-30 August 1974. Dordrecht, Países Bajos: Springer Netherlands.

Newmaster, S. J., Newmaster, S. G., Fazekas, A. J. & Ragupathy, S. (2006). *DNA barcoding in land plants: Evaluation of rbcL in a multigene tiered approach.* Canadian Journal of Botany, 84 (3), 335-341. DOI: 10.1139/b06-047.

Nicolalde-Morejón, F., Vergara-Silva, F., González-Astorga, J., Stevenson, D. W., Vovides, A. P. & Sosa, V. (2011, abril). *A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding.* Cladistics, 27 (2), 150-164. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2010.00321.x.

Nikam, T. D., Bansude, G. M. & Kumar, K. C. A. (2003, octubre). *Somatic embryogenesis in sisal (Agave sisalana Perr. ex. Engelm).* Plant Cell Reports, 22 (3), 188-194. DOI: 10.1007/s00299-003-0675-9.

Nobel, P. S. (1976, octubre). *Water relations and photosynthesis of a desert CAM plant Agave deserti.* Plant Physiology, 58 (4), 576-582.

Nobel, P. S. (1994). *Remarkable Agaves and cacti.* Nueva York, EE.UU.: Oxford University Press.

Nobel, P. S. (2003). *Environmental biology of Agaves and cacti.* Nueva York, EE.UU.: Cambridge University Press.

Nobel, P. S. & Hartsock, T. L. (1978, abril). *Resistance analysis of nocturnal carbon dioxide uptake by a crassulacean acid metabolism succulent Agave deserti.* Plant Physiology, 61 (4), 510-514.

Nobel, P. S. & Hartsock, T. L. (1979, enero). *Enviromental influences on open stomates of a crassulacean acid metabolism plant Agave deserti.* Plant Physiology, 63 (1), 63-66

Nobel, P. S. & Sanderson, J. (1984). *Rectifier-like activities of roots of two desert succulents.* Journal Experimental of Botany, 35 (5), 727-737.

Nock, C. J., Waters, D. L., Edwards, M. A., Bowen, S. G., Rice, N., Cordeiro, G. M. & Henry, R. J. (2011, abril). *Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification.* Plant Biotechnology Journal, 9 (3), 328-333. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00558.x.

Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. & Olvera, C. (2003, junio). *Molecular characterization of inulosucrase from Leuconostoc citreum: A fructosyltransferase within a glucosyltransferase.* Journal of Bacteriology, 185 (12), 3606-3612.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L. & Thonart, P. (2007, abril). *Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants.* Environmental Microbiology, 9 (4), 1084-1090.

Pagnussat, G. C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. & Lamattina L. (2002, julio). *Nitric oxide is required for root organogenesis.* Plant Physiology, 129 (3), 954-956.

Palomino, G., Dolezel, J., Méndez, I. & Rubluo, A. (2003). *Nuclear genome size analysis of Agave tequilana Weber.* Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 56 (1), 37-46.

Palomino, G., Martínez, J., Cepeda-Cornejo, V. & Pimienta-Barrios, E. (2012). *Nuclear genome size and cytotype analysis in Agave cupreata Trel. & Berger (agavaceae).* Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 65 (4), 281-294. DOI: 10.1080/00087114.2012.752915.

Palomino, G., Martínez, J. & Méndez, I. (2005). *Citotipos en Agave angustifolia Haw. determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos.* Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 21 (Suplemento 1), 49-54.

Palomino, G., Martínez, J. & Méndez, I. (2007). *Variación inter e intraespecífica en especies de Agave por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas.* En P. Colunga-GarcíaMarín, A. Larqué-Saavedra, L. E. Eguiarte & D. Zizumbo-Villareal (Eds.), *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros Agaves* (pp. 41-64). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán/ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Instituto Nacional de Ecología.

Palomino, G., Martínez, J. & Méndez, I. (2008). *Karyotype studies in cultivars of Agave tequilana Weber.* Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 61 (2), 144-153.

Palomino, G., Martínez, J. & Méndez, I. (2010, diciembre). *Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de Agave aktites Gentry (Agavaceae).* Revista Mexicana de Biodiversidad, 81 (3), 655-662.

Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I., Cepeda-Cornejo, V., Barba-González, R. & Rodríguez-Garay, B. (2015). *Nuclear genome size and cytotype analysis in Agave parviflora Torr. subsp. flexiflora Gentry (Asparagales, Asparagaceae).* Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 68 (3), 159-168. DOI: 10.1080/00087114.2015.1032575.

Pérez, C. (2007, julio/septiembre). *Mezcales tradicionales de los pueblos de México, herencia cultural y biodiversidad.* Ciencias (87), 55-60.

Pilbeam, J. (2013). *A gallery of Agaves (incluiding variegates).* Hornchurch, Essex, Inglaterra: British Cactus & Succulent Society, 314 pp.

Pimienta-Barrios, E., Robles-Murguia, C. & Nobel, P. S. (2001, junio). *Net CO_2 uptake for Agave tequilana in a warm and a temperate environment*. Biotropica, 33 (2), 312-318. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2001.tb00181.x.

Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J. & García-Galindo, J. (2006, noviembre/diciembre). *Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de Agave tequilana*. Agrociencia, 40 (6), 699-709.

Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., Rosas-Espinoza, V. C., Valenzuela-Tapia, A. & Nobel, P. S. (2005). *Young daughter cladodes affect CO_2 uptake by mother cladodes of Opuntia ficus-indica*. Annals of Botany, 95 (2), 363-369. DOI: 10.1093/aob/mci034.

Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A. & Rodríguez-Garay, B. (2007, diciembre). *Somatic embryogenesis in Agave tequilana Weber cultivar azul*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 43 (6), 569-575. DOI: 10.1007/s11627-007-9046-5.

Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A. & García-Lara, S. (2015, 23 de noviembre). *Micropropagation of Agave salmiana: Means to production of antioxidant and bioactive principles.* Frontiers in Plant Science, 6, artículo e1026. DOI: 10.3389/fpls.2015.01026.

Qui-Zapata, J. A., García-Vera, A. G., Rincón-Enríquez, G., Vega-Ramos, K. & Uvalle-Bueno, J. (2015). *Protección de Trichoderma harzianum contra Fusarium oxysporum en Agave tequilana*. Revista Mexicana de Fitopatología, 33 (Suplemento), S67.

Quiñones-Aguilar, M., López-Pérez, L., Solís-Sánchez, A., Vega-Ramos, K., Uvalle-Bueno, J., Qui-Zapata, J. & Rincón-Enríquez, G. (2014). *Biocontrol of soft rot Agave by bacteriophages*. En A. Gutiérrez Mora (Ed.), B. Rodríguez-Garay, S. M.

Contreras-Ramos, M. R. Kirchmayr & M. González-Ávila (Comps.), *Sustainable and integral exploitation of Agave* (pp. 52-56). México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Consultado el 23 de noviembre de 2015 de http://www.ciatej.mx/*Agave*/1.11*Agave*.pdf.

Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Núñez-Palenius, H. G. & Ochoa-Alejo, N. (2008, agosto). *In vitro propagation of three Agave species used for liquor distillation and three for landscape*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94 (2), 201-207. DOI: 10.1007/s11240-008-9405-x.

Ramírez-Tobías, H. M., Peña-Valdivia, C. B. & Aguirre, J. R. (2014). *Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de Agave a la restricción de humedad*. Botanical Sciences, 92 (1), 131-139. DOI: 10.17129/botsci.156.

Rico-Lemus, M. & Rodríguez-Garay, B. (2014). *SNP as an effective donor of nitric oxide for in vitro Plant Cell and Tissue Culture*. Journal of Plant Biochemistry and Physiology, 2 (3), e127. DOI:10.4172/2329-9029.1000e127.

Rieger, R., Michaelis, A. & Green, M. M. (1982). *Diccionario de Genética y Citogenética clásica y molecular.* Alhambra, Madrid, España: Pearson Educación.

Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E., Qui-Zapata, J., Vega-Ramos, K. & Uvalle-Bueno, J. (2014). *Selección de bacteriófagos para el control biológico del agente causal de la pudrición del Agave tequilana*. Revista Mexicana de Fitopatología, 32 (Suplemento), S112.

Ritchie, W. (2014). *An assessment of CBOL plant DNA barcodes in the genus Manfreda Salisb. (Asparagaceae) for utility in species identification and phylogenetic studies.* Bradleya (32), 172-178

Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G. & Herrera-Alamillo M. A. (2006). *An efficient method for the micropropagation of Agave species.* En V. M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant cell culture protocols* (Segunda edición, serie Methods in Molecular Biology, 318). Totowa, NJ, EE.UU.: Humana Press.

Rodríguez-Garay, B. (2011, 29 de agosto al 2 de septiembre). *Genetic improvement of Agaves.* 1st International Symposium on *Agave*. Guadalajara, Jalisco. México.

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. & Acosta-Dueñas, B. (1996a, enero). *Somatic embryogenesis of Agave victoria-reginae Moore*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46 (1), 85-87. DOI: 10.1007/BF00039700.

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, M., Arrizon, J., Loera-Quezada, M. M., Flores-Berrios, E. P., Rincón-Enríquez, G., Quiñones-Aguilar, E. E. & Qui-Zapata, J. A. (2015). *La materia prima: Agave tequilana Weber var. azul.* En A. C. Gschaedler-Mathis, B. Rodríguez-Garay, R. Prado-Ramírez & J. L. Flores-Montaño (Eds.), *Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas* (Segunda edición, pp. 17-53). Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. & Santacruz-Ruvalcaba, F. (1996b). *Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas.* En J. Izquierdo & G. Palomino (Eds.), *Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas*. Santiago, Chile: Oficina Regional para América Latina y el Caribe.

Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo-Hernández, G., Rodríguez-Domínguez, J. M., Rodríguez-Garay, B., Cervantes-Martínez, J. & Castellanos-Hernández, O. A. (2011, febrero). *Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of Agave tequilana Weber var. azul.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104 (2), 271-275. DOI: 10.1007/s11240-010-9815-4.

Ruvalcaba-Ruíz, D., Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I. & Rodríguez-Garay, B. (2012). *In vitro induction of a trisomic of Agave tequilana Weber var. azul (Agavaceae) by para-fluorophenylalanine treatment*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 48 (1), 144-152. DOI: 10.1007/s11627-011-9405-0.

Sánchez, V. & Rebolledo, O. (2010, diciembre). *Especies de Trichoderma en suelos cultivados con Agave tequilana en la región de Los Altos Sur, Jalisco y valoración de su capacidad antagónica contra Thielaviopsis paradoxa.* Revista Mexicana de Micología, 32, 11-18.

Sánchez-Marroquín, A., Larios, C. & Vierna, L. (1967). *Estudios sobre la microbiología del pulque XIX. Elaboración de la bebida mediante cultivos puros.* Revista Latinoamericana de Microbiología Parasitología (9), 83-85.

Santacruz-Ruvalcaba, F. (2001). *Transformación genética mediante biobalística en Agave tequilana Weber var. azul.* Tesis de doctorado sin publicar. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

Sánchez-Urbina, A., Ventura-Canseco, L. M. C., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Pérez-Farrera, M. A., Dendooven, L. & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2008, agosto). *Seed germination and in vitro propagation of Agave grijalvensis an endemic endangered Mexican species.* Asian Journal of Plant Sciences, 7 (8), 752-756. DOI: 10.3923/ajps.2008.752.756.

Simpson, J., Martínez-Hernández, A., Juárez, M. J. A., Sandoval, S. D., Villarreal, A. S. & Romero, C. C. (2011, febrero). *Genomic resources and transcriptome mining in Agave tequilana.* GCG Bioenergy, 3 (1), 25-36. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2010.01079.x.

Singh, B. & Satyanarayana, T. (2011, abril). *Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion*. Physiology and Molecular Biology of Plants, 17 (2), 93-103. DOI: 10.1007/s12298-011-0062-x.

Spardo, D. & Gullino, M. L. (2004, marzo). *State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases.* International Journal of Food Microbiology, 91 (2), 185-194. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00380-5.

Stewart, J. R. (2015, 24 de septiembre). *Agave as a model CAM crop system for a warming and drying world.* Frontiers in Plant Science (69), artículo 684. DOI: 10.3389/fpls.2015.00684.

Tan, B. C., Chin, C. F. & Alderson, P. (2013, noviembre). *Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of Vanilla planifolia Andrews*. In vitro Cellular and Developmental Biolgy-Plant, 49 (5), 626-630. DOI: 10.1007/s11627-013-9526-8.

Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R. & Gayathramma, K. (2007, octubre). *Induction of somatic embryos from cultures of Agave vera-cruz Mill.* In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 43 (5), 423-428. DOI: 10.1007/s11627-007-9088-8.

The Angiosperm Phylogeny Group-AGP. (2009). *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II.* Botanical Journal of the Linnean Society (161), 105-121. DOI: 10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x

Thiede, J. (2001). *Agavaceae*. En U. Eggli (Ed.), *Illustrated handbook of succulent plants: Monocotyledons* (pp. 5-76). Berlín, Alemania: Springer-Verlag.

Trinidad Cruz, J., Quiñones-Aguilar, E., López-Pérez, L., Qui-Zapata, J. & Rincón-Enríquez, G. (2014). *Mycorrhization of Agave cupreata for prevention of wilt caused by Fusarium oxysporum.* En A. Gutiérrez Mora (Ed.), B. Rodríguez-Garay, S. M. Contreras-Ramos, M. R. Kirchmayr & M. González-Ávila (Comps.), *Sustainable and integral exploitation of Agave* (pp. 57-61). México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Consultado el 23 de noviembre de 2015 de http://www.ciatej.mx/*Agave*/1.12*Agave*.pdf.

Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E. & Paredes-López, O. (2006, julio). *Plant regeneration of Agave tequilana by indirect organogenesis*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 42 (4), 336-340. DOI: 10.1079/IVP2006788.

Vidal, R. (1925). *Breeding work with henequén and sisal.* Journal of Heredity (16), 9-12.

Vijayan, K. & Tsou, C. (2010, diciembre). *DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective*. Current Science, 99 (11), 1530-1541.

Vinent Serrano, E. & Fajardo Gutiérrez, O. (2009, enero/abril). *Mejoramiento genético de Agaves en Cuba*. *Temas de Ciencia y Tecnología.* Revista de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (37), 37-43.

Werbrouck, S. P. O., Strand, M., Van-Onckelen, H. A. & Debergh, P. C. (1996, octubre). *Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture?* Physiologia Plantarum, 98 (2) 291-297. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1996.980210.x.

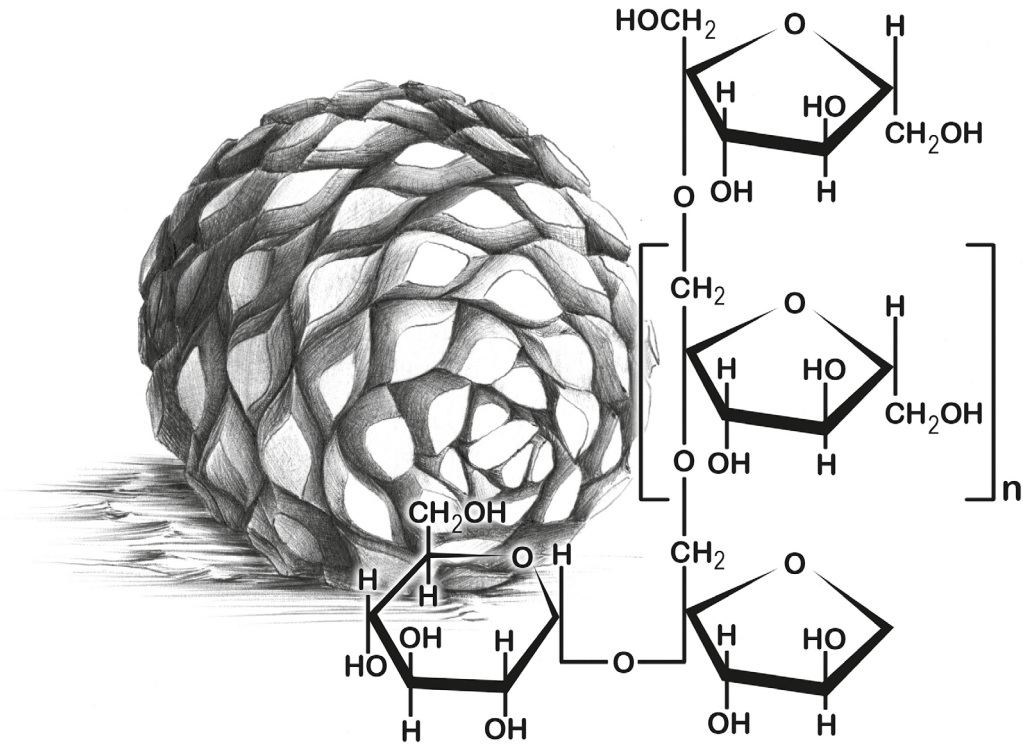
Werbrouck, S. P. O., Van-der-Jeugt, B., Dewitte, W., Prinsen, E., Van-Onckelen, H. A. & Debergh, P. C. (1995, julio). *The metabolism of benzyladenine in Spathiphyllum floribundum "Schott Petite" in relation to acclimatization problems.* Plant Cell Reports, 14 (10), 662-665. DOI: 10.1007/BF00232734.

Whipps, J. M. (1997). *Developments in the biological control of soil-born plant pathogens.* Advances in Botanical Research, 26, 1-134. DOI: 10.1016/S0065-2296(08)60119-6.

Whitlock, B. A., Hale, A. M. & Groff, P. A. (2010, 13 de julio). *Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode.* Plos One, 5 (7), e11533. DOI: 10.1371/journal.pone.0011533.

Winter, K., García, M. & Holtum, J. A. (2014, julio). *Nocturnal versus diurnal CO_2 uptake: How flexible is Agave angustifolia?* Journal of Experimental Botany, 65 (13), 3695-3703. DOI: 10.1093/jxb/eru097.

2. FRUCTANOS DE AGAVE: ACTUALIDAD Y PERSPECTIVAS



PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO
Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

López, M.G., Camacho-Ruíz, R.M., González-Avila, M., Mellado-Mojica, E., Moreno-Vilet, L., Godínez-Hernández, C.I., Aguirre-Rivera, J.R., De la Mora-Amutio, M., Juárez-Flores, B. I., Ramos-Clamont Montfort, G., Armenta-Corral, R. I., Prado-Ramírez, R., Mendoza-Rivera M. Á., Arrizon, J., Andrade-González, I., Aldrete-Herrera, P. I., Ortiz-Basurto, R. I.

RESUMEN

La utilización de los agaves en zonas áridas y semiáridas de México para la producción de fructanos de agave, constituye un potencial económico para estas regiones al ser su único sustento, lo que demanda propuestas científicas y tecnológicas para lograr un conocimiento profundo respecto a la composición y perfil de distribución que presentan las diferentes especies de agaves, así como la relación entre la estructura de los fructanos y su efecto biológico y tecnológico.

Existe un amplio potencial para los fructanos de agave, los cuales son una mezcla de isómeros de fructosa, que incluye inulinas y se distinguen por la presencia de agavinas, estructuras ramificadas, con potencial para impartir propiedades funcionales biológicas y tecnológicas de gran interés en el desarrollo de nuevos productos en la industria de alimentos y farmacéutica. La mayor investigación y producción industrial se ha realizado con fructanos de *A. tequilana*, principalmente. Sin embargo, estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demuestran que el campo de aplicación es muy amplio, y se magnifica con el estudio de otras especies de *Agave*, que han presentado propiedades de interés, tanto para mejorar las características sensoriales de un alimento como para impartirle propiedades prebióticas que mejoren la salud del consumidor. En la comercialización de fructanos de agave se han establecido normas mexicanas para regular los parámetros de caracterización fisicoquímica y microbiológica, sin embargo, aún se requiere un amplio trabajo de investigación para mejorar los procesos de extracción y técnicas de caracterización. De este modo se promoverá el uso potencial y aplicación industrial de los fructanos y fracciones de fructanos de agave con propiedades específicas.

Una solución a corto plazo, es aprovechar la vinculación que ha promovido AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, para establecer estrategias de investigación y transferencia tecnológica, que permitan a las universidades y centros de investigación dar respuesta a las interrogantes de las industrias procesadoras para cumplir normativas y superar limitantes de mercado. Al fortalecer esta vinculación, se logrará el soporte de información específica y suficiente para que los productos expandan su comercialización a mercados internacionales, al demostrar la funcionalidad biológica y tecnológica que están presentado los fructanos de agave y derivados a nivel internacional.

Palabras clave: *Fructanos de agave, a*gavinas, caracteriz*ación, aplicación, efecto prebiótico, normatividad.*

2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Agave* almacenan fructanos como principal carbohidrato de reserva (López *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006). En este género, *Agave tequilana* Weber var. azul sobresale como un cultivo con importancia agronómica en México por ser la materia prima principal para la elaboración de tequila (NOM-002-SAGARPA-2015), por la capacidad prebiótica de sus fructanos y su efecto sistémico en la salud (Urías-Silvas *et al.*, 2008; Urías-Silva y López, 2009).

El término genérico de fructanos se emplea para los oligosacáridos y polisacáridos que contienen enlaces glicosídicos con fructosas en su estructura (Benkeblia, 2013). En las plantas, los fructanos se sintetizan a partir de una molécula aceptora de sacarosa (Ristema y Smeekens, 2003). Las fructosas pueden unirse tanto a la glucosa, como a la fructosa, generando una gran diversidad de fructanos. En los fructanos de agave, las fructosas se unen mediante enlaces β (2-1) y β (2-6) produciendo moléculas ramificadas. En la industria alimentaria la fuente de fructanos más utilizada hasta el momento es la inulina. Sin embargo, existe un amplio potencial para los fructanos de agave, los cuales son una mezcla de isomeros de fructosa, que incluye inulinas y se distinguen por la presencia de agavinas, estructuras ramificadas con potencial para impartir propiedades funcionales biológicas y tecnológicas de gran interés a la industria de alimentos.

El jugo de agave se ha utilizado para la obtención de jarabes fructosados, es alrededor del año 2000 que surgen tecnologías enfocadas a la obtención de derivados de agave en polvo conteniendo principalmente fructanos de agave. A partir de su caracterización en el 2003 la industria inicia a comercializarlos bajo la norma NMX-F-591-SCFI-2010 misma que describe los tipos de fructanos reconocidos y autorizados comercialmente.

En los últimos años, se ha incrementado potencialmente el interés en la extracción, caracterización y uso de fructanos de agave como un ingrediente potencial de alimentos funcionales, ya sea por sus propiedades tecnológicas o nutracéuticas. Por ello, se han extraído fructanos de diferentes especies de *Agave* y se han realizado evaluaciones del efecto biológico tanto de los fructanos nativos, como de las fracciones de alto, intermedio y bajo grado de polimerización a nivel *in vitro* como *ex vivo* e *in vivo* con base a sus propiedades funcionales. El campo de aplicación para los fructanos de agave es muy amplio, tanto para mejorar la funcionalidad de un alimento como para impartirle características prebióticas que mejoren la salud del consumidor.

En esta revisión sobre el estado del arte de los fructanos de agave, se presenta la importancia de las estructuras características de éstos, procesos de extracción, modificación, y en el desarrollo de nuevos productos, así como normas que se están proponiendo para la estandarización y autentificación de los mismos.

2.2 TIPOS DE ESTRUCTURAS

Existen reportes e información bibliográfica de la presencia de fructanos en el género *Agave* desde 1888 (Suzuki, 1993), destacando *Agave vera-cruz* Mill, *A. americana, A. deserti* y *A. tequilana* Weber var. azul, como las especies más estudiadas. La presencia de fructanos tipo inulina en *Agave vera-cruz* Mill se reportó a inicios de los años 50´s (Srinivasan y Bhatia, 1953; 1954), identificando grados de polimerización que van de 3 a 15 unidades de fructosa (Satyanarayana, 1976a-1976c). Sin embargo, un año después, Dorland *et al.*, (1977) reportaron la presencia de fructanos de mayor complejidad, es decir, oligosacáridos altamente ramificados relacionados con inulinas neoseries y graminanos. Respecto a *Agave americana*, Bhatia y Nandra (1979), reportaron en esta especie fructanos lineales tipo inulina. De igual forma Wang y Nobel (1998) reportaron en *A. deserti* la presencia de fructanos tipo neoserie, además de la presencia de oligosacáridos, Kestosa (GP3) y Nistosa (GP4). El primer reporte de la presencia de fructanos en *Agave tequilana* Weber var. azul fue descrito por Sánchez-Marroquín y Hope (1953), denotando fructanos tipo inulina como el carbohidrato de reserva en esta planta; fue 50 años después que López *et al.*, (2003) elucidaron por primera vez la estructura distintiva de los fructanos del género *Agave*, denominados *"agavinas"* (Mancilla-Margalli y López, 2006). Éstos, son fructanos que exhiben una de las mayores complejidades estructurales pues están constituidos de enlaces β (2-1) y β (2-6), que son enlaces al C1 y C6 de la glucosa (fructanos tipo neoserie), así como de fructanos tipo graminano; ambos altamente ramificados (Mancilla-Margalli y López, 2006). En el mismo trabajo se caracterizaron los fructanos de varias especies de *Agave* sp. y *Dasylirion* spp., encontrando que *A. tequilana* Weber var. azul, es una de las especies que almacena una alta cantidad de carbohidratos solubles no estructurales (Figura 2.1), constituyendo los fructanos la mayoría de éstos (>60%), seguido por la fructosa, sacarosa y glucosa.

Aunado a esto, mediante el uso de herramientas como cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases acoplado a un detector de masa (GC-MS) se ha logrado caracterizar estructuras de los fructanos de las diferentes especies. Las principales diferencias que muestran los fructanos de las especies analizadas son de tipo cuantitativo, ya que no se observaron diferencias estructurales significativas y con base en esto se clasificaron los fructanos de estas plantas. La clasificación de los fructanos de las especies analizadas se realizó con base en: Grado de polimerización (GP) promedio, proporción agavinas/graminanos (glucosa interna/terminal), relación de enlaces tipo inulinas/levanos [β (2-1)/ β (2-6)], así como en la presencia y frecuencia de ramificaciones (Mancilla-Margalli y López, 2006). De acuerdo a los anteriores criterios los fructanos de las diferentes especies del género *Agave* se clasificaron en tres grupos principales (Tabla 2.1), donde en el grupo I (conformado por *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. potatorum*) se encuentran los fructanos de mayor GP promedio (18 unidades), con una mayor relación o proporción de agavinas respecto a graminanos

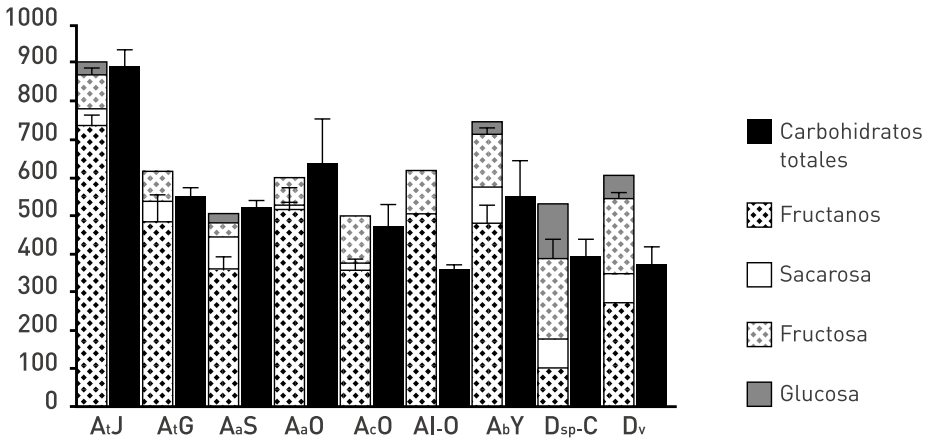


Figura 2.1 Contenido de carbohidratos solubles no estructurales en las diferentes especies del género *Agave*. At-J: *Agave tequilana* Weber var. azul (Jalisco); At-G: *A. tequilana* Weber var. azul (Guanajuato); Aa-S: *A. angustifolia* (Sonora); Aa-O: *A. angustifolia* (Oaxaca); Ap-O: *A. potatorum* (Oaxaca); Af-Y: *A. fourcroydes* (Yucatán); Dsp-C: *Dasylirion* spp. (Chihuahua); Dv: *Dalia variabilis*. Mancilla-Margalli y López (2006).

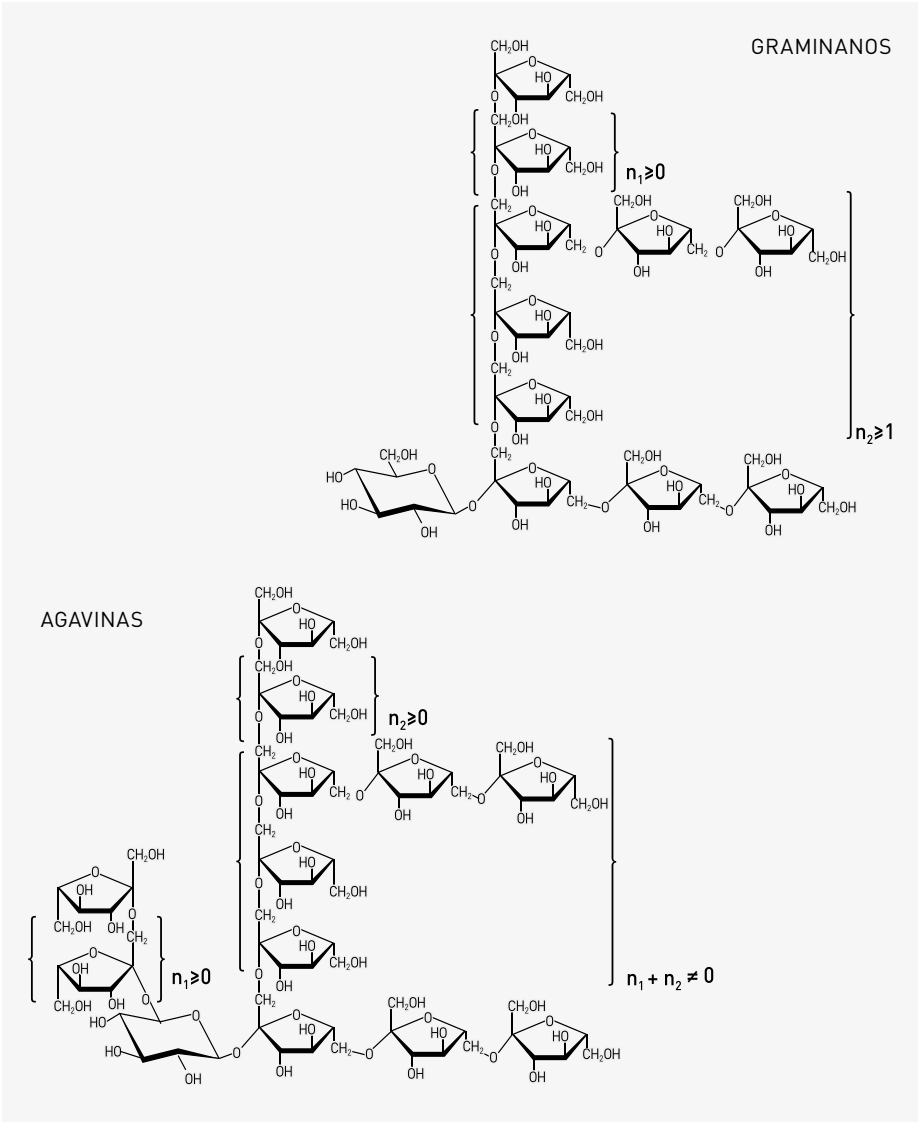
TABLA 2.1 Características estructurales de los fructanos del género *Agave*.

	GP[a] estimado	*α*-D-Glc*p*	*i-α*-D-Glc*p*	*t-α*-D-Fru*f*	*(2-6)-β*-D-Fru*f*	*(2-1)-β*-D-Fru*f*	*1,6-di-β*-D-Fru*f*
Grupo I							
At-J	18.12	0.20	0.79	4.70	3.46	5.53	3.42
Aa-S	13.07	0.18	0.82	4.51	1.90	3.92	1.74
Aa-O	31.75	0.21	0.79	10.51	6.01	9.64	4.59
Ap-O	15.34	0.17	0.83	5.19	2.12	4.84	2.19
Grupo II							
Ac-O	11.17	0.33	0.67	4.27	0.95	3.71	1.24
Af-Y	6.66	0.31	0.69	2.81	0.49	1.82	0.55
Dsp-C	9.09	0.38	0.62	3.21	0.84	3.08	0.96
Grupo III							
At-G	7.13	0.52	0.48	2.99	0.65	1.75	0.74
Estándar[b]							
Dv	37.43	1	nd	2.44	nd	33.17	0.82
Ac	4.79	0.66	0.34	2.38	nd	1.32	0.09

GP: Grado de polimerización; **A/G:** *Agavina/Graminano*; **nd:** no detectado; **At-J:** *Agave tequilana* Weber var. azul (Jalisco); **Aa-S**: *A. angustifolia* (Sonora); **Aa-O:** *A. angustifolia* (Oaxaca); **Ap-O:** *A. potatorum* (Oaxaca). **Af-Y:** *A. fourcroydes* (Yucatán); **Dsp-C:** *Dasylirion* spp. (Chihuahua); **Dv:** *Dalia variabilis;* **Ac:** Cebolla. Mancilla-Margalli & López (2006).

(4/1), determinándose además que estos fructanos son altamente ramificados, ya que aproximadamente se presenta una ramificación cada cuatro residuos de fructosa de la cadena principal (Figura 2.2).

Mellado-Mojica y López (2012) elucidaron la diversidad estructural de los fructanos almacenados en *A. tequilana* Weber var. azul a lo largo de su ciclo biológico en campo, esto es en los fructanos extraídos



de plantas de 2 a 7 años de edad. Se observaron diferencias reales en la composición de los enlaces glicosídicos que presentan los fructanos de *A. tequilana* Weber var. azul de acuerdo a la edad de la planta (Tabla 2.2) incrementando su grado de polimerización (GP) (rango de GP6 a GP23), la proporción de agavinas respecto a los fructanos tipo graminanos; así como el número y frecuencia de ramifiaciones (Mellado-Mojica y López, 2012).

Con la información recopilada se propusieron posibles estructuras moleculares a los fructanos almacenados en plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de diferentes edades en el campo (Figura 2.3).

De acuerdo a estudios reportados, conforme aumenta la edad de la planta en campo, los fructanos almacenados en *A. tequilana* se vuelven moléculas más complejas, en las cuales se muestra un incremento gradual tanto en GP, como de la presencia y

TABLA 2.2 Composición de enlaces glicosídicos en fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul de acuerdo a la edad de la planta en el campo.

Edad[a]	GP[b]	*α*-D-Glc*p*	*i*-*α*-D-Glc*p*	*t*-*β*-D-Fruc*f*	*(2-6)*-*β*-D-Fruc*f*	*(2-1)*-*β*-D-Fruc*f*	*1,6-bi*-*β*-D-Fruc*f*
2	5.9±1.2	0.5±0.1	0.5±0.1	2.0±0.3	0.4±0.2	1.9±0.5	0.6±0.2
3	7.0±1.0	0.4±0.1	0.6±0.1	2.4±0.5	0.6±0.2	2.4±0.4	0.7±0.1
4	8.2±1.4	0.4±0.1	0.6±0.1	2.7±0.2	0.8±0.2	2.9±0.5	0.9±0.5
5	9.9±2.4	0.2±0.1	0.7±0.1	3.1±0.5	1.0±0.5	3.5±1.0	1.2±0.6
6	16.2±5.9	0.3±0.1	0.7±0.1	5.2±2.2	1.9±0.9	6.3±2.4	1.8±0.6
7	23.2±2.4	0.2±0.1	0.8±0.1	7.4±1.2	3.3±0.6	8.9±1.1	2.6±0.5
FOS[c] (Ci)[d]	14.8	1.0	nd	1.7	nd	11.8	0.3

a: Edad de planta en años; **b:** Grado de polimerización estimado de cada especie tomando como base la suma de la abundancia relativa de la D-glucopiranosa interna (*i*-*α*-D-Glc*p*) y terminal (*α*-D-Glc*p*) como unidad; **c:** Fructooligosacáridos de *Cichorium intybus*, estandar. Mellado-Mojica y López (2012).

Figura 2.2 Estructuras moleculares propuesta para los fructanos del género *Agave* (graminanos y agavinas) del Grupo I. Mancilla-Margalli y López (2006).

frecuencia de ramificaciones a lo largo de su ciclo biológico. Aunado a esto, se puede concluir que existen diferencias en cuanto a la edad y al tipo de fructano almacenado, es decir, las plantas en etapas tempranas de maduración almacenan casi la misma proporción de graminanos y agavinas, mientras que las plantas en etapas cercanas a la maduración (mayor contenido de fructanos) almacenan principalmente neofructanos. Mellado-Mojica *et al.,* (2016), reportaron en un estudio de *A. tequilana,* que las plantas están sujetas a diversos tipos de estrés, así como cambios bioquímicos y fisiológicos a lo largo de su desarrollo y esto puede afectar a las enzimas que sintetizan fructanos, y en consecuencia, el tipo y caracteristicas de los fructanos almacenados.

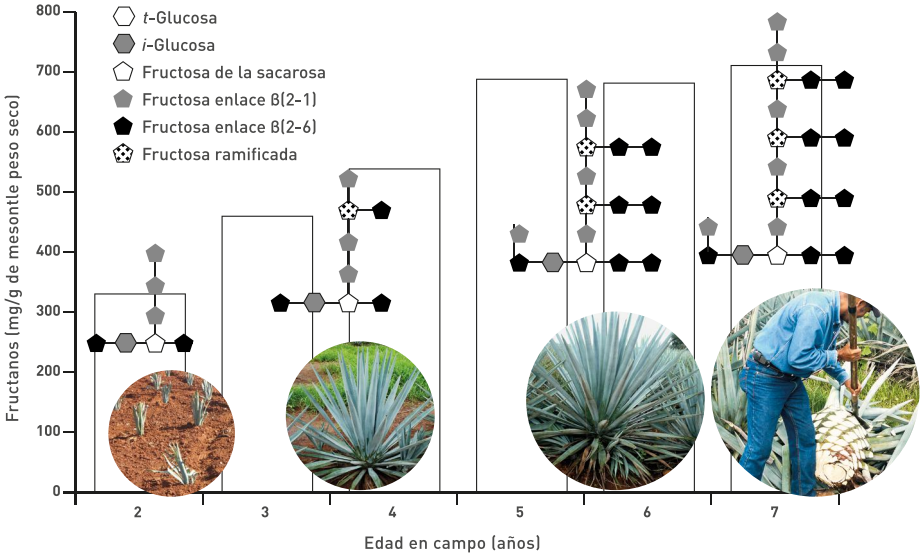


Figura 2.3 Metabolismo de fructanos en *Agave tequilana* Weber var. azul a lo largo de su ciclo biológico en el campo. Mellado-Mojica y López (2012).

2.3 PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN Y MODIFICACIÓN DE FRUCTANOS

Los fructanos de agave pueden ser extraídos de la piña por presión o por lixiviación. Antes de someterse a alguno de estos procesos, las piñas deben ser trituradas o desfibradas para lograr la mayor extracción de fructanos, a esta operación se le denomina "*preparación*".

» *Preparación del agave (desfibrado)*

La piña de agave está formada por un centro o corazón al cual están unidas las hojas que fueron cortadas al ser jimada la planta, en la cosecha en campo. Las bases de las hojas o pencas, están formadas por fibras largas alineadas en el sentido en que se han desarrollado. Para desfibrar las piñas de agave se hace uso de trituradoras de machetes o cuchillas, seguida de una desfibradora de cadenas, o de la secuencia desfibradora de erizos-desintegradora de disco tipo astilladora. La desintegradora de discos también puede procesar piñas de agave enteras o a la mitad.

» *Extracción de los fructanos por presión*

Los sistemas de presión o molienda que se pueden utilizar para el agave crudo son los mismos que para agave cocido: molinos de rodillos y prensas de tornillo. Cuando se pretende realizar la extracción de fructanos a partir de agave crudo, los molinos de rodillos o mazas cilíndricas no presentan un desempeño aceptable debido a la dureza del agave, además de la dificultad de introducir el agave entre las mazas giratorias, razón que impide el uso de este método para fines de producción a escala industrial. Comparativamente, la presión utilizando prensas de tornillo o expeller, tiene mejores rendimientos cuando se procesa agave crudo, debido a que el material es obligado a fluir por los alabes del tornillo, siendo comprimido conforme avanza y se reduce el paso entre los alabes o el diámetro del tornillo. Este equipo actualmente es empleado en proyectos industriales.

Los fructanos de agave pueden ser extraídos de la piña por presión o por lixiviación

» *Extracción de fructanos por lixiviación*

La lixiviación de los fructanos de agave, se realiza mediante el uso de un solvente (agua) a temperaturas entre 75 y 85°C y es una práctica común hoy en día en el medio industrial.

Dado que el agave presenta una naturaleza fibrosa y se conoce ya la cantidad de agua por cada kg de fibra de agave que se requiere para lograr una concentración adecuada de fructanos en el extracto, se puede pensar en utilizar el principio del lecho fijo y de lecho móvil de agave desfibrado, haciendo pasar el agua caliente a través de ese lecho.

Aspecto del bagazo después del cocimiento y de la molienda, en el transcurso de la fermentación

Desde finales de los años noventa, se realiza la lixiviación de los fructanos de agave mediante equipos llamados "*difusores*", siguiendo el principio del lecho móvil. Tales equipos operan en etapas múltiples (hasta 20), en régimen continuo utilizando agua que circula en sentido opuesto al avance de la cama móvil de agave desfibrado.

A nivel industrial, los difusores son los equipos más utilizados para la obtención de fructanos de agave crudo. El uso de los difusores permite obtener la mayor recuperación de fructanos de la materia prima, sin embargo, el jugo rico en fructanos que se obtiene, obliga a aplicar varias etapas de purificación con el fin de reducir o eliminar una serie de componentes diversos como minerales, gomas y trazas de proteínas y grasas, entre otros.

» *Procesos de separación de fructanos de agave en pilotos de filtración*

La tecnología de filtración con membrana se ha convertido en una alternativa importante en los procesos que involucren la separación, purificación y/o concentración de productos de interés en la industria de alimentos, ésta es la tecnología más utilizada para la separación de fructanos lineales. La separación de los fructanos de agave en función a su grado de polimerización se ha estudiado recientemente, se han propuesto metodologías como la ultrafiltración que puede utilizarse para obtener fracciones de diferentes grados de polimerización. Con esta metodología se obtienen productos como los siguientes: fructanos de cadena larga (FFCL) enriquecidos en fructanos con grado de polimerización mayor a 10, fructanos de cadena corta (FFCC) enriquecidos con moléculas con grado de polimerización menor a 10 y jarabe fructosado funcional (JFF) con mono y disacáridos mayoritariamente (Alvarado *et al.*, 2014). Se ha reportado la ultrafiltración fina a través de membranas de 1 kDa como proceso para la separación de glucosa, fructosa y sacarosa de jugo de agave natural, con este proceso se obtiene un producto de fructanos de agave con grados de polimerización entre 3 y 29, prácticamente libre de fructosa (Moreno-Vilet *et al.*, 2013). Por otro lado se ha utilizado la tecnología de ultrafiltración tangencial para la separación de fructanos utilizando membranas de

1kDa que ha permitido obtener fructanos de alto grado de polimerización (HGPF) y fructanos de alto desempeño (HPF) estos fructanos han sido utilizados como lioprotectores de plasma bovino (Rodríguez-Furlan *et al.*, 2014). Se ha reportado la obtención de fracciones enriquecidas de fructanos de agave de alto, intermedio y bajo GP en un sistema de filtración tangencial escala piloto industrial (Figura 2.4), los cuales se caracterizan y aplican en el desarrollo de productos alimentarios (Aldrete-Herrera, 2013; Ortiz-Basurto, 2008).

Algunas otras alternativas con uso de solventes han sido propuestas para la separación de fructanos de agave, sin embargo, su extrapolación a nivel proceso industrial está muy limitada, por lo que sólo se aplica a nivel laboratorio.

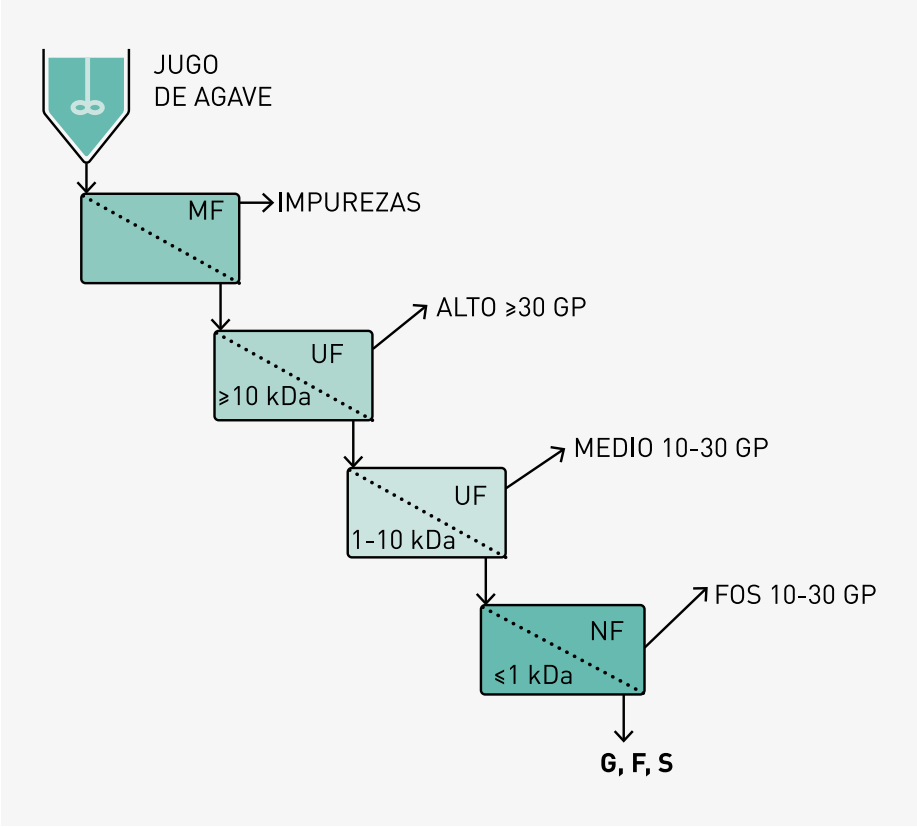


Figura 2.4 Diagrama de filtración escalonada para la obtención de fracciones de fructanos de agave en pilotos de filtración tangencial **MF**=Microfiltración; **UF**=Ultrafiltración; **NF**=Nanofiltración (Instituto Tecnológico de Tepic). Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto.

2.4 MÉTODOS PARA LA HIDRÓLISIS DE FRUCTANOS DE AGAVE

Los carbohidratos solubles en agua contenidos en el jugo resultante del proceso de lixiviación o por presión son principalmente fructanos de agave. Los fructanos son polisacáridos formados por moleculas de fructosa con generalmente, una glucosa terminal o intermedia.

Los fructanos son clasificados de acuerdo al tipo de enlaces químicos que presentan y por su grado de ramificación en los siguientes grupos: las inulinas, que presentan una estructura lineal con enlaces β-2,1; los levanos, que presentan una estructura lineal con enlaces β-2,6; los fructanos mixtos, los cuales presentan una estructura ramificada con enlaces β-2,6 y β-2,1, de acuerdo a lo publicado por Roberfroid (2007).

Uno de los métodos utilizados para obtener fructosa [...] es la hidrólisis por medio de calor y adición de ácidos

Los fructanos son los polisacáridos que constituyen la principal forma de almacenamiento de energía, protegen a las plantas de la sequía y de la deshidratación causada por bajas temperaturas (Wang y Nobel, 1998). Se ha reportado que las plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul, acumulan durante su crecimiento, cantidades crecientes de fructanos mixtos con estructuras ramificadas (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953) los cuales poseen un grado de polimerización o GP, de entre 3 y 35 unidades (López *et al.*, 2003). Los fructanos pueden ser hidrolizados para obtener azúcares capaces de ser fermentados, principalmente fructosa, utilizando para este fin tratamientos ácido-térmicos o enzimáticos, estas técnicas son descritas enseguida.

» *Hidrólisis utilizando calor y ácido*

Uno de los métodos utilizados para obtener fructosa a partir de los fructanos de agave es la hidrólisis por medio de calor y adición de ácidos. En la industria tequilera se utiliza la hidrólisis térmica, que consiste en llevar a cabo la cocción de las piñas por adición de calor, ya sea en autoclave o en horno de mampostería, estos procesos suelen requerir prolongados periodos de tiempo que van de las 12 horas en el caso de la cocción en autoclave o de 30 horas o más cuando se utilizan hornos. Generalmente cuando se obtienen jugos crudos por presión o lixiviación es común llevar a cabo la hidrólisis de los fructanos utilizando calor y pH ácido. Para lograr la hidrólisis de los fructanos de agave contenidos en el jugo crudo se requiere bajar el pH minimo a 3 y elevar la temperatura a 80°C. Los ácidos utilizados para lograr la disminución del pH pueden ser el ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, también se pueden emplear resinas de intercambio catiónico para el mismo propósito. La hidrólisis ácido térmica es

muy eficiente y rápida lográndose rendimientos del 100% de los carbohidratos presentes en el jugo en tiempos de alrededor de cuatro horas (Zúñiga *et al.*, 1997; Ávila-Fernández *et al.*, 2011). Una de las desventajas en los tratamientos químicos o térmicos es la generación de inhibidores de la fermentación como el hidroximetilfurfural, además se prefiere disminuir el uso de ácidos en los procesos para disminuir riesgos a la salud. Es desable encontrar métodos alternativos que sean útiles para obtener azúcares fermentables a partir de los fructanos contenidos en los jugos crudos, una opción es la hidrólisis enzimática.

Piñas dispuestas a ser hidrolizadas en fábrica "Nutriagaves, S.A. de C.V.". Ayotlán, Jalisco.

» *Hidrólisis de fructanos utilizando enzimas*

La producción de jarabes fructosados por hidrólisis enzimática de fructanos de agave ha sido estudiada y reportada por numerosos autores, sin embargo no es muy utilizada a nivel industrial debido al alto costo de las enzimas (Zúñiga *et al.*, 1997; García-Aguirre *et al.*, 2009; Michel Cuello *et al.*, 2012). También se ha explorado el empleo de enzimas en la hidrólisis de fructanos de agave para la generación de azúcares fermentables libres, mismos que pueden ser empleados en la producción de bebidas como el tequila, se ha reportado incluso que no existen diferencias sensoriales importantes entre tequilas producidos por hidrólisis enzimática y aquellos obtenidos por hidrólisis ácida (Ávila-Fernández *et al.*, 2009; Waleckx *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2013). Incluso se han realizado ensayos de hidrólisis enzimática a nivel industrial empleando enzimas comerciales tipo inulinasas. Estas enzimas inulinasas (EC 3.2.1.7) también conocidas como β-2,1 fructan-fructanohidrolasas llevan a cabo la hidrólisis de fructanos linealies tipo inulina con enlaces β-2,1. El empleo de enzimas a nivel industrial supone ventajas económicas ya que puede llevarse a cabo a temperaturas moderadas de reacción (50 - 60°C) y a valores de pH a los que normalmente se obtiene el jugo de agave (4.7 y 5.5), por otro lado los tiempos de reacción suelen ser cortos, dependiendo éstos de la cantidad de enzima empleada (0.0125% a 0.12% v/v). El coctel comercial más utilizado en hidrólisis enzimática de fructanos de agave es Fructozyme L (Novozymes, Novo Nordisk), este coctel contiene principalmente dos actividades enzimáticas provenientes de *Aspergillus niger*: exo-inulinasas (EC 3.2.1.80) y

endo-inulinasas (EC 3.2.1.7). La hidrólisis de fructanos ramificados como los del agave es posible debido a la sinergia de ambas enzimas, sin embargo se ha reportado que cuando se emplean enzimas del tipo endo-inulinasa (libres de la actividad exo) como por ejemplo la enzima comercial Novozyme ®960 (Novozymes, Novo Nordisk) la hidrólisis de los fructanos de agave no es factible debido a que las endo-inulinasas no son capaces de hidrolizar fructanos ramificados como los del agave, ya que estas enzimas están especiliazadas en fructanos lineales tipo inulina como los de achicoria. Los fructanos de agave al ser ramificados suponen un problema de impedimento estérico para las endoinulinasas (Alvarado, *et al.*, 2014). Debido a esta baja preferencia de las inulinasas por hidrolizar fructanos de agave, se ha incursionado en la búsqueda de enzimas con preferencia por hidrolizarlos, se ha reportado que las enzimas producidas por la levadura *Kluyveromyces marxianus* son más eficaces en la obtención de fructosa a partir de fructanos comparado con los cocteles comerciales Fructozyme® y Novozyme 960® (Arrizon *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante continuar con la búsqueda de nuevas enzimas capaces de hidrolizar a los fructanos de agave de manera eficiente ya que su aplicación a nivel industrial podría redundar en la obtención de jarabes libres de inhibidores como los furanos producidos por acción del calor, además se evitaría el empleo de agentes químicos de riesgo como los ácidos.

2.5 BIOCONJUGADO

Se ha estudiado la síntesis de ésteres de ácidos grasos con fructanos de *Agave tequilana* por acilación enzimática, dichas moléculas se utilizan como surfactantes no iónicos con un amplio espectro de aplicaciones. Las enzimas que se han utilizado para lograr la acilación han sido lipasas comerciales inmovilizadas (lipozyme). Esta acilación fue realizada en fructooligosacáridos ramificados de agave con grado de polimerización mayor a 10, se lograron obtener mono y di ésteres de laurato, sin embargo la falta de estándares complica la cuantificación (Casas-Godoy *et al.*, 2014).

2.6 SECADO

Para lograr la estabilización y fácil manejo de los fructanos de agave, generalmente se utiliza el secado por aspersión. Se ha reportado la optimización de la microencapsulación de fructanos de *Agave tequilana* Weber var. azul utilizando secado por aspersión, se usó metodología de superficie de respuesta empleando un diseño estadístico Box-Behnken para establecer las condiciones óptimas de secado. Se optimizó el proceso hasta obtener el máximo rendimiento, la mejor solubilidad mejorando la higroscopicidad, actividad de agua y azúcares reductores. Se encontró que la temperatura de salida óptima es entre 70 y 80°C, con una velocidad de atomización de 20,000 y 30,000 rpm, flujo de aire de 0.2 a 0.23 m^3/s (Chávez-Rodríguez *et al.*, 2014).

2.7 FRUCTANOS DE AGAVE COMO MATERIA PRIMA Y SU CARACTERIZACIÓN

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el uso de fructanos de agave como un ingrediente potencial de alimentos funcionales, ya sea por sus propiedades tecnológicas o nutracéuticas. Muchas de sus aplicaciones dependen de la longitud de la cadena, ya que ésta determina sus características fisicoquímicas. Si bien, los usos de los fructanos de agave no se han explorado totalmente, de forma general se asocia que: los fructanos de cadena larga presentan gran interés de aplicación por sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, mientras que los de cadena corta por sus propiedades funcionales como prebiótico. Por lo anterior, los fructanos de agave requieren una caracterización como materia prima; en primer lugar son considerados polímeros, debido a que están constituidos por unidades repetitivas de fructosa, cuya longitud está determinada por el número de unidades que se repiten en la cadena, a esto se le conoce como grado de polimerización (GP). Con respecto al tamaño de cadena, se le conoce como fructooligosacáridos (FOS) a los fructanos con GP menores a 10, mientras el término fructanos se utiliza de forma general a los de mayor GP (Gonzales, 2012). En el caso del *Agave tequilana* Weber var. azul, se acumulan durante su crecimiento, cantidades crecientes de fructanos mixtos ramificados (Wang y Nobel, 1998), los cuales poseen un GP de entre 3 y 37 unidades (Lopez *et al.*, 2003; Mancilla-Margalli y López, 2006; Michel-Cuello *et al.*, 2012; Ravenscroft *et al.*, 2009), aunque se han reportado hasta GP de 70 sólo en el tallo del agave (Praznik *et al.*, 2013). Aldrete-Herrera en 2013 reportó un GP aparente de 80 en *A. tequilana*. Los parámetros de calidad de los fructanos de agave se están definiendo en términos de sus compuestos mayoritarios y minoritarios, particularmente la proporción de FOS y fructanos, el GP, el contenido de monosacáridos, de cenizas y de humedad, lo cual determina la pureza de los compuestos mayoritarios de interés (fructanos de agave). Estos parámetros de calidad al igual que el rendimiento de fructanos son dependientes de la especie, las condiciones del suelo, la región de cultivo, la madurez cronológica y fisiológica de la planta, así como de las características de la materia prima utilizada, ya sea la piña (tallo más bases foliares con mayor o menor longitud) o sólo el tallo (órgano de almacenamiento de reservas), ya que son estructuras morfológicas de la planta con funciones fisiológicas distintas.

Los fructanos de cadena larga presentan gran interés de aplicación por sus propiedades fisicoquímicas y reológicas, mientras que los de cadena corta por sus propiedades funcionales como prebiótico

2.8 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

Existen metodologías sencillas para evaluar parámetros de calidad de los fructanos de agave, como son contenido de monosacáridos, cenizas, saponinas y humedad, por otro lado se han desarrollado métodos analíticos para profundizar en detalle su composición y estructura. Así, existen técnicas de cribado (screening) como la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), semi cuantitativas como la cromatografía en capa fina de alta resolución (HP-TLC, por sus siglas en inglés) que permiten identificar y cuantificar compuestos presentes en una muestra al compararlos con patrones de estándares (Alvarado *et al.*, 2014). Algunas otras técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) con columna de intercambio iónico, permite la identificación y cuantificación de mono, di, tri y tetra-sacáridos mediante un estándar externo, sin embargo, la limitante de esta técnica es que los fructanos mayores que cinco grados de polimerización los integra en una sola área, en el mismo tiempo de retención del estándar de inulina de achicoria, sin que los fructanos de agave sean precisamente iguales a los de inulina, debido a lo reportado por López *et al.*, (2003) los fructanos de agave son de estructuras complejas y ramificadas. En cuanto al grado de polimerización promedio se ha recurrido a estimaciones por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HP-SEC, por sus siglas en inglés), mediante compuestos de peso molecular conocidos (dextrinas), y a la abundancia que presenta cada polímero de fructosa de diferente grado de polimerización de la muestra; estas estimaciones indican el grado de poli dispersión de fructanos (Camacho-Ruíz y Hernández López, 2015).

Los métodos analíticos comúnmente utilizados para la determinación del grado de polimerización de fructanos de agave son los siguientes:

» *Hidrólisis enzimática*

La cuantificación de fructanos por el método enzimático, consiste en purificar el fructano para que esté libre de otros polisacáridos y posteriormente se hidroliza con un coctel de inulinasas. La fructosa resultante se cuantifica por los métodos tradicionales. Aunque esta técnica ha funcionado bien para los fructanos del tipo inulina (lineal con enlaces β-2,1), subestima la cuantificación de fructanos ramificados y complejos como los del agave ya que el coctel de endo y exo inulasas utilizados no logra hidrolizar por completo los enlaces β-2,6) presentes. Además con esta técnica sólo se puede obtener la concentración de fructanos totales y no un perfil de tamaños de fructanos o cuantificación de FOS (Chacón, 2006).

» *Cromatografía de intercambio iónico*

La Cromatografía de Intercambio Aniónico de Alto Rendimiento con Detector de Pulsos Amperométricos (también conocida como HPAEC-PAD por sus siglas en inglés), es una de las técnicas más utilizadas para determinar la longitud de cadena y polidispersidad del GP en fructanos de diferentes vegetales (Benkeblia, 2013). Éste es el método oficial para la detección y cuantificación de oligofructanos en el método 997.08 de la AOAC el cual es útil para cualquier alimento y ha demostrado ser muy confiable y exacto (Coussement, 1999). Se ha demostrado la

capacidad de esta técnica con gradientes lineales, para separar en picos individuales a los fructanos tipo inulina. Sin embargo, en la separación de fructanos de agave, se ha logrado con éxito la separación de fructo-oligosacáridos. No es posible la separación de fructanos de agave con GP>10, con gradientes lineales debido a la complejidad de estructuras que presentan los fructanos de agave, discutida anteriormente. Ortiz-Basurto (2008), reportó el uso de gradientes escalonados para inducir la separación de fructanos de agave con GP>10 en grupos. Al comparar los tiempos de elusión de los perfiles obtenidos de los fructanos de agave con un estándar de inulina, con el mismo gradiente, se puede determinar la polidispersidad y el GP aparente de fructanos de agave de diferentes especies y/o fracciones enriquecidas de fructanos de agave. Entre los inconvenientes que podemos encontrar en este método es que muestran resultados con desviaciones estándar elevadas, cuando la muestra tiene alto contenido de azúcares, maltodextrinas y/o almidón (Madrigal y Sangronis, 2007).

» *Espectrometría de masas*

El MALDI-TOF se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight (Tiempo de Vuelo). Es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que se ha utilizado para la vinculación y la determinación de secuencias de oligosacáridos y puede ser considerado una herramienta eficaz para la caracterización estructural de los carbohidratos, que ofrece resultados precisos con versatilidad analítica y muy alta sensibilidad. Esta técnica analítica ha sido utilizada con éxito para determinar el tamaño molecular, permitiendo la caracterización de la masa molar dando el máximo GP, y una fácil verificación de la media de GP desde el registro de una señal para cada cadena presente en la muestra. El inconveniente principal, una vez más, es la necesidad de un equipo MALDI-TOF, el cual es un equipo muy sofisticado que implica altos costos y requiere personal capacitado para su uso. Además, es difícil obtener un cromatograma donde se incluya toda la dispersión de tamaños de una sola muestra, ya que según las condiciones de operación, se favorece la visualización de altos o bajos pesos moleculares, más no de ambos. Evans *et al.*, (2016) reportaron que esta técnica es menos efectiva en identificar especies de alto peso molecular.

» *Cromatografía en capa fina*

Se implementó una técnica de cromatografía en capa fina (TLC) para la cuantificación de oligosacáridos de diferente peso molecular. Se emplearon estándares como fructosa; 1-kestosa, nistosa, sacarosa y oligosacáridos de glucosa comerciales, debido a que en el mercado no es posible encontrar estándares de oligómeros de fructosa. Aunque no fue posible la cuantificación de todos los oligosacáridos presentes en los fructanos, la técnica reveló una buena separación de los oligómeros de fructosa contenidos en los fructanos de agave y fue posible identificar perfiles típicos de acuerdo a la migración de las moléculas (Alvarado *et al.*, 2014).

Este método permite la caracterización de dichos perfiles en muestras de fructanos comerciales así como la discriminación entre fructanos de agave y fructanos de achicoria.

» *Fracciones de Fructanos - HPLC*

Una muestra de jugo de agave contiene principalmente fructooligosacáridos (FOS) de GP menor a 10, Fructanos de GP mayor a 10, sacarosa, glucosa y fructosa. Así el perfil de carbohidratos se puede determinar combinando técnicas cromatográficas y de filtración. La estrategia general es determinar la concentración inicial de sólidos solubles con un refractómetro y por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) la concentración de sacarosa-glucosa-fructosa de la muestra de jugo de agave purificado y clarificado (JA). Posteriormente la muestra se filtra con una membrana MWCO 3kDa para separar la mayor proporción de fructanos>10 (A) de los FOS<10 (B). Finalmente JA, A y B se hidrolizan a totalidad por intercambio iónico y nuevamente se determina la concentración de glucosa-fructosa por HPLC, esto representa el 100% de carbohidratos en la muestra y por diferencia se estima la proporción de A y B. Este método permite estimar rápidamente la proporción de fructanos grandes y chicos en una muestra (Alvarado *et al.*, 2014).

Una muestra de jugo de agave contiene [...] fructooligosacáridos (FOS) de GP menor a 10, fructanos de GP mayor a 10, sacarosa, glucosa y fructosa.

» *Cromatografía de exclusión*

La caracterización de un polímero requiere conocer la distribución de pesos moleculares en la muestra y una de las técnicas analíticas utilizada para conocer esta distribución es por cromatografía de exclusión de tamaños de alta resolución (HP-SEC). A partir de ella se pueden obtener curvas de distribución de pesos moleculares (Praznik *et al.*, 2013). La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas; y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria; en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular (Harris, 2007). Se han implementado métodos para determinar la distribución de tamaños en fructanos de agave comerciales, utilizando cromatografía de exclusión (Camacho-Ruíz y Hernández-López, 2015).

2.9 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE FRUCTANOS EN ALIMENTOS

Hay dos métodos oficiales para la cuantificación de fructanos en los alimentos, El método 999.03 y 997.08 de la AOAC. Ambos métodos analíticos están diseñados para inulina / FOS. La metodología 999.03 es un método enzimático espectrofotométrico que consiste en la extracción de fructanos del alimento utilizando agua caliente. El extracto es tratado con invertasa y amilasa para romper los enlaces de la sacarosa y almidón presentes en la muestra y obtener así azúcares reductores, en este punto del método se tiene solo azúcares reductores y fructanos. Los azúcares reductores provenientes del almidón y la sacarosa son reducidos a poli-alcoholes, utilizando borohidruro de sodio. Después por acción de exo y endo-inulinasas se rompe los fructanos presentes en la muestra obteniéndose azúcares reductores, los cuales son cuantificados mediante el método colorimétrico PAHBAH (Madrigal y Sangronis, 2007).

Hay un inconveniente importante en este método ya que también los grupos terminales reductores de moléculas de los fructanos se reducen en alditol, por lo tanto estos grupos terminales escapan del análisis; esto implica que la recuperación de difructosa (F2) es sólo el 50%, para kestosa (F3) 67%, para nistosa (F4) 75% … progresivamente. La metodología de la AOAC 999.07, consta de tres fases; extracción, hidrólisis enzimática y determinación de azúcares por cromatografía. En el primer paso se extraen los fructanos y se cuantifican azúcares libres en la muestra, posteriormente se somete a hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa y se cuantifican azúcares libres provenientes de la hidrólisis del almidón, para posteriormente hacer una segunda hidrólisis con inulinasas y se hace una determinación de azúcares, obteniendo los azúcares totales (glucosa y fructosa total) y a partir de la cuantificación de azúcares en cada fase se puede obtener el contenido total de fructanos (Prosky y Hoebregs, 1999).

2.10 EFECTO BIOLÓGICO DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

Los estudios realizados para evaluar el efecto prebiótico *in vitro* tanto de los fructanos de agave como de otras plantas, han utilizado como modelos, diferentes cepas de bacterias probióticas entre las que se incluyen principalmente especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Arrizon *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2010; Gonzalez-Avila *et al.*, 2014; Hernández-Moedano *et al.*, 2014; López-Molina *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2011; Velázquez-Martínez *et al.*, 2014), ya que se ha demostrado que dichos géneros bacterianos son habitantes intestinales naturales de diversos mamíferos y que a través del metabolismo de los prebióticos, generan diferentes beneficios a los hospederos. Este efecto prebiótico de los fructanos de agave también ha sido probado en simuladores de tracto digestivo (Hernández-Moedano *et al.*, 2014; Ruiz-Alvarez *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que los géneros Bifidobacterium y Lactobacillus son habitantes intestinales naturales de diversos mamíferos...

En la suplementación de fructanos en ratas diabéticas (D), las concentraciones de glucosa en cuanto al efecto biológico de los fructanos de agave, se ha observado que el grado de polimerización de los fructanos influye directamente con el efecto prebiótico de los mismos, como lo demostraron Urías-Silvas y López (2009) y posteriormente Velázquez-Martínez y colaboradores (2014), al probar tres fracciones de fructanos obtenidos de *Agave angustifolia* Haw con diferente grado de polimerización (GP): GP alto (3-60 unidades de fructosa), GP medio (2-40 unidades de fructosa) y GP bajo (2-22 unidades de fructosa) en diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los resultados mostraron que en general, la fracción con GP bajo (2-22 unidades de fructosa) fue la que más estimuló el crecimiento de las cepas evaluadas (*Bifidobacterium lactis* DSM 10140, *B. animalis* ATCC 25527 *B. longum* ATCC 15707, *B. breve* ATCC 15700, *B. adolecentis* ATCC 15703, *B. infantis* ATCC 17930, *B. bifidum* ATCC 29521, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei)*, demostrando su uso potencial como prebiótico. También demostraron que el efecto prebiótico depende de la cepa bacteriana utilizada, pues *L. paracasei* subsp. *paracasei* y *B. bifidum* ATCC 29521 pudieron asimilar las tres fracciones de fructanos sin diferencia significativa.

Además del grado de polimerización y la cepa bacteriana utilizada, el tipo de fructanos también parece influir en el desarrollo de ciertos probióticos y patógenos intestinales. Arrizón y colaboradores (2014) mostraron en su estudio que los fructanos de *Agave tequilana* estimulan el crecimiento de los probióticos aerobios evaluados: *Lactobacillus ácidophilus*, *L. casei, L. rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*, mientras que el levano y la inulina

estimularon el crecimiento de probióticos anaerobios: *Bifidobacterium lactis* y *B. adolescentis*. Además, la producción de metabolitos extracelulares de los probióticos, inducida por los fructanos de agave, tuvieron un efecto antibiótico contra *Clostridium* spp., *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.

Se ha demostrado también que el efecto prebiótico de los fructanos puede variar entre especies de *Agave* y entre las regiones de cultivo de la misma especie de *Agave*, como reportaron Urías-Silvas y López (2009) al evaluar el efecto de los fructanos de *Agave tequilana* de Guanajuato (ATG) y Jalisco (ATJ), *A. angustifolia* de Sonora (AAS) y Oaxaca (AAO), *A. potatorum* (APO) y *A. cantala* (ACO) de Oaxaca y *A. fourcroydes* de Yucatán (AFY). Sus resultados muestran que los fructanos ATG fueron un mejor sustrato que los de ATJ. El mismo comportamiento se observó con AAS y AAO, siendo AAS mejor sustrato para las bacterias. Esto puede explicarse si tomamos en cuenta la diversidad estructural de los fructanos dependiente de las especies de *Agave* (Mancilla-Margalli y López 2006), lo cual debe estar relacionado con los nutrientes de la zona de cultivo.

El efecto prebiótico de los fructanos puede variar entre especies de Agave y entre las regiones de su cultivo

En otro estudio, se evaluó el efecto prebiótico de fructanos obtenidos de *A. tequilana* Weber de diferentes regiones de los estados de Colima y Zacatecas como alternativa de aprovechamiento de la planta debido a que se encuentra fuera de la zona de Denominación de Origen del Tequila (DOT). Se comparó el efecto prebiótico de los fructanos de agave con la inulina de achicoria en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Manassas, USA y *Lactobacillus delbrueckii sbp bulgaricus* (NRRL-734). Los fructanos de agave de Zacatecas sin purificar generaron un mayor efecto prebiótico en *L. delbrueckii* en comparación con la inulina de achicoria. Una vez purificados se probaron fracciones con GP bajo (<10 unidades), GP alto (> 10 unidades) y la mezcla de ambas fracciones, tanto para los fructanos de agave, como para los de achicoria. La mezcla de las fracciones (GP bajo + GP alto) de los fructanos de agave tiene un efecto prebiótico similar: 0.138±0.01 h, 0.475±0.06 h para *B. subtilis* y *L. delbrueckii* respectivamente, al igual que con la inulina comercial de achicoria (Synergy1™): 0.107±0.01 h, 0.404±0.06 h para las mismas cepas (Gonzalez-Avila *et al.*, 2014).

» *Efecto biológico in vivo de los fructanos de agave*

Los fructanos son carbohidratos no reductores constituidos por moléculas de fructosa unidas mediante un enlace β-2,1 fructosil-fructosa y una molécula de glucosa (Madrigal y Sangronis, 2007). Fueron reconocidos por la FDA (Food and

Drug Administration) desde 1992 como ingredientes GRAS (Generally Recognized as Safe), lo que indica que pueden usarse sin restricciones en formulaciones alimenticias. El consumo diario de fructanos ha demostrado tener beneficios como: aumento de la biodisponibilidad de calcio (Delzenne *et al.*, 1995; López *et al.*, 2003), refuerzo de las funciones inmunológicas (Kulkarny y Reddy, 1994; Mukhopadhay *et al.*, 1991), mejora del metabolismo de las grasas (Delzenne y Kok, 1998; Delzenne y Kok, 1999) y mejora en la respuesta glucémica (Luo *et al.*, 1996; Baird *et al.*, 1980).

Debido a su estructura química, los fructanos no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas de los mamíferos...

Debido a su estructura química, los fructanos no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas de los mamíferos, por lo que permanecen intactos en su paso por la parte superior del tracto gastrointestinal, hasta llegar al intestino grueso, donde las bacterias los hidrolizan y fermentan en su totalidad, sirviendo así como prebiótico. En 1995, Gibson y Roberfroid definieron como prebiótico a cualquier ingrediente alimenticio no digerible que benéficamente afecta al hospedero estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando la salud del huésped. Roberfroid en el 2007, modificó esta definición dejándola sólo como: *"Ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora gastrointestinal, confiriendo bienestar y salud a quien lo consuma".* Para cumplir con dicha función, los fructanos deben ser fermentados por bacterias en el colon. El colon, junto con su microbiota bacteriana, es un importante órgano que ofrece una gran variedad de funciones como: digestión, fermentación, actividad metabólica, actividad inmunológica y otras funciones de protección, así como funciones de desintoxicación, que son esenciales para el organismo.

Además de los residuos alimenticios, el principal contenido del intestino grueso son bacterias, en una cantidad de $1x10^{11}$ por gramo de materia seca. Existen cientos de especies identificadas, pero solo 30 o 40% corresponden al 99% de la biomasa (Cummings, 1997). Entre los géneros de bacterias que se encuentran en el colon están: *Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Eubacterium, Escherichia* y *Lactobacillus* (Gibson, 2004). De estos géneros bacterianos, los que han demostrado tener un efecto benéfico para la salud del hospedero son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Blaut, 2002). Estos dos grupos de bacterias tienen presente la enzima β-Fructofuranosidasa que les permite hidrolizar de manera adecuada a los fructanos (MacDonald *et al.*, 1978; Ehrmann *et al.*, 2003).

Los fructanos al tener enlace β-2,1 resisten a la digestión enzimática del tracto gastrointestinal superior, llegando intactos hasta el colon en donde se ven sometidos a la fermentación bacteriana, gracias a la enzima antes mencionada. Resultado de esta fermentación, se obtienen diversos productos, tales como lactato, ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés, Short Chain Fatty Acids) y gases, productos del metabolismo anaerobio (Kelly, 2008). Existen diversas enfermedades que afectan al colon y se ha demostrado que el consumo diario de fructanos reduce la incidencia de algunas ellas por ejemplo: infecciones agudas (diarrea en infantes) (Duggan, 2003), cáncer de colon (Pool, 2005), colitis ulcerosa (Casellas *et al.*, 2007; Besteiro, 2004), enfermedad de Crohn (Lindsay *et al.*, 2006), estreñimiento (Kleessen *et al.*, 1997) y síndrome de colon irritado (Paineau, 2008). El cáncer de colon es una enfermedad de relevancia mundial por su alto índice de mortalidad y por la relación tan estrecha que mantiene con los hábitos alimenticios. Diversas investigaciones señalan que ciertos componentes de la dieta contribuyen a la prevención de ésta y otras enfermedades relacionadas con la alimentación como la diabetes y obesidad, se ha demostrado que los fructanos de agave contribuyen a reducir el riesgo de cáncer colorrectal al ser suministrados en la dieta. Otra de las enfermedades que en la actualidad han adquirido una gran importancia debido al incremento en su incidencia y a los problemas de salud que genera, es la diabetes. La suplementación con fructanos de agave en la dieta han mostrado su potencial para prevenir el desarrollo de esta enfermedad.

Urías-Silvas y colaboradores (2008) evaluaron el efecto fisiológico de fructanos extraídos de *Agave tequilana* y *Dasylirion* spp. Se usó un modelo animal con ratones macho de la cepa C57B1/6J cuyo alimento se suplementó con un 10% de fructanos de achicoria (RAF), de agave (TEQ), *Dasylirion* (DAS) sobre el metabolismo de lípidos y glucosa. A otro grupo se le suministró alimento estándar (STD) durante 5 semanas. El peso corporal y el consumo de alimento fue significativamente menor en los animales suplementados con fructanos con respecto a los que recibieron la ración estándar. Los parámetros metabólicos de glucosa y colesterol disminuyeron significativamente en los animales que recibieron fructanos. La concentración de triglicéridos en los animales suplementados con fructanos. Sólo RAF provocó una disminución en la concentración de triglicéridos.

Dos experimentos (Exp. 1 = ratas con peso normal; Exp. 2 = ratas obesas) fueron desarrollados por Rendón-Huerta y colaboradores (2012) para comparar los efectos de fructanos con diferente origen (*Chicorium intybus, Helianthus tuberosus* y *Agave angustifolia*) en el cambio de peso corporal, metabolitos en sangre y heces, así como bacterias en ratas no diabéticas (ND) y diabéticas (D). En el Exp. 1, el aumento de peso corporal total y el consumo diario de alimento en ratas D y ND disminuyeron, los recuentos fecales de *Clostridium* y la esteatosis hepática disminuyeron. En cambio, las concentraciones de HDL en sangre y los recuentos fecales de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aumentaron debido al consumo de fructanos. En el exp. 2, el aumento de peso corporal total y el consumo diario de alimento en

ratas D y ND disminuyeron por la suplementación de fructanos. En las ratas D, las concentraciones de glucosa en la sangre disminuyeron debido a los fructanos. En ratas D, el colesterol y LDL en sangre, y la esteatosis hepática disminuyó por el consumo de fructanos de *A. angustifolia*. Tanto para ratas ND y D, los conteos fecales de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* fueron mayores ($P < 0.05$) debido a la suplementación de fructanos. Con este estudio se concluyó lo siguiente:

1. No hubo diferencia significativa en la variación de peso de los tratamientos obesos (sano y diabético).
2. Los fructanos de *A. tequilana* y de *C. intybus*, reducen la ganancia de peso sobre los tratamientos no obesos sanos.
3. Los fructanos de *A. tequilana* disminuyen los niveles de glucosa en individuos obesos y no obesos diabéticos.
4. En individuos no obesos sanos y diabéticos, fructanos de *A. tequilana* y *H. tuberosus* reducen los niveles de colesterol total.
5. El mayor incremento de HDL se obtuvo con fructanos de *A. tequilana* en ratas obesas.
6. Los fructanos de *A. tequilana* estimulan el crecimiento de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, reducen las poblaciones de especies pertenecientes a los géneros *Escherchia* y *Clostridium*.
7. El consumo de fructanos de *A. tequilana* en la ración alimenticia mexicana, podrían prevenir el riesgo de padecer enfermedades crónico degenerativas, como es el caso de la diabetes mellitus, así como enfermedades cardiovasculares.

En el estudio de Dávila-Céspedes, y colaboradores (2014), se utilizó un modelo animal para inducir cáncer de colon y se observó el efecto de disminución de biomarcadores tempranos de la enfermedad FCA (Focos de Criptas Aberrantes) en individuos que fueron alimentados con fructanos de maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana* Otto ex Salm Dick). Los resultados obtenidos fueron comparados con el efecto de los fructanos de achicoria (*Chicorium intybus*). Los datos generados sugieren que los fructanos de *A. salmiana* pueden contribuir a reducir el riesgo de cáncer colorectal al ser incluidos en el régimen alimenticio ya que redujeron significativamente ($p<0.05$) la cantidad de FCA en las ratas que los consumieron con respecto de las que no lo hicieron.

Por otro lado, Márquez-Aguirre *et al.*, (2013), realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* para probar la seguridad de los fructanos obtenidos de *Agave tequilana* Weber var. azul. Además, realizaron un experimento *in vivo* utilizando un modelo de obesidad inducida por dieta para comparar el efecto de fructanos de agave con diferente grado de polimerización (GP), usaron fructanos de agave con GP> 10 (LFC), FOS agave con GP <10 (SCF), y fructanos de agave con y sin desmineralización (DTF, TF) frente a los fructanos de achicoria comerciales (OraftiSynergy1™). Las variables que midieron fueron: cambio de peso corporal, grasa, colesterol total, triglicéridos y el recuento de *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp en heces. Los resultados mostraron que los fructanos *A. tequilana* no son mutagénicos y son seguros para su consumo, incluso a una

dosis de 5g por kg de peso corporal. Los ratones obesos que recibieron SCF mostraron una disminución significativa en la ganancia de peso corporal, el tejido graso y el colesterol total sin aumentar el recuento fecal de bifidobacterias. Por otro lado, en ratones obesos que recibieron LFC y TF mostraron disminución de triglicéridos y un aumento del recuento de fecal bifidobacterias. Sorpresivamente, a pesar de que ratones obesos recibieron DTF no mostraron cambios en la ganancia de peso corporal, tejido graso, colesterol total o triglicéridos, sólo mostraron un incremento en el conteo de bifidobacterias. Estos resultados demuestran que tanto el grado de polimerización y el proceso de desmineralización pueden influir en la actividad biológica de fructanos de agave.

Los datos generados sugieren que los fructanos de A. salmiana pueden contribuir a reducir el riesgo de cáncer colorectal al ser incluidos en el régimen alimenticio

Reyes-Becerril *et al.*, (2014) evaluaron los efectos individuales o combinados de *Lactobacillus sakei* con inulina sobre el sistema inmunológico en peces de cultivo. Por ensayos *in vitro*, *L. sakei* cepa 5-4 mostró actividad antibacteriana contra los patógenos de peces ensayadas (excepto la cepa *Vibrio harveyi* CAIM-1793). *L. sakei* fue capaz de sobrevivir a concentraciones biliares de pescado altas. La fermentación de los fructanos de agave provocó un gran aumento en el número de lactobacilos. Para el estudio *in vivo*, los peces fueron alimentados durante 8 semanas con cuatro dietas: dieta de control (control), *L. sakei* 5-4 (10^7 CFU/g), la inulina (1%) y *L. sakei* (10^7 CFU/g) + inulina (1%). El aumento de peso mostró claramente el efecto sinérgico de *L. sakei* y la inulina a las 6 y 8 semanas de tratamientos. En ensayos de PCR en tiempo real, se encontró que los transcritos de ARNm de inmunoglobulina M (IgM) que se expresa en el intestino superior, riñón cabeza, moco, el bazo y la piel. Por otra parte, los niveles de expresión de mRNA de IgM en la cabeza riñón e intestino anterior se midieron por PCR en tiempo real. *L. sakei* 5.4 y *L. sakei* + inulina complementa la dieta regulada hasta la expresión de IgM en la semana 4 y 8 en el intestino y la cabeza del riñón, respectivamente. Estos resultados apoyan la idea de que el *L. sakei* 4.5 solo o combinado con fructanos de agave mejora el crecimiento y estimula el sistema inmunológico de cabrilla sardinera.

Ramnani *et al.*, (2015), realizaron un estudio controlado con placebo, aleatorizado, doble ciego cruzado de alimentación humana. El objetivo fue determinar el efecto prebiótico de fructanos de agave. Participaron en este estudio un total de treinta y ocho voluntarios. El tratamiento consistió en la administración de alimento suplementado con 5 g/d de fructanos de

agave (predilife) o placebo equivalente (maltodextrina), esta parte del experimento duró tres semanas seguido de un período de dos semanas de lavado, después del cual los sujetos se intercambian para alternar el tratamiento durante tres semanas seguidas por uno de dos semanas de lavado. Se recolectaron muestras fecales al inicio del estudio, en el último día de tratamiento (días 22 y 58) y lavado (días 36 y 72), respectivamente. Los cambios en las poblaciones de bacterias fecales, SCFA e IgA se evaluaron utilizando hibridación *in situ* fluorescente, GC y ELISA, respectivamente. Las evacuaciones, consistencias de heces, confort abdominal y cambios de humor se evaluaron mediante un cuestionario diario registrado. En paralelo, se estudió el efecto de fructanos de agave en diferentes regiones del colon usando un simulador de cultivo continuo de tres etapas. Predilife aumentó significativamente bifidobacterias fecales (log10 9·6 (sd 0·4)) y lactobacilos (log10 7 ·7 (sd 0·8)) en comparación con placebo (log10 9·2 (sd 0·4), p = 0·00) (log10 7·4 (sd 0·7); P = 0·000), respectivamente. No se observó ningún cambio para otros grupos de bacterias ensayadas, SCFA, IgA secretora, y las concentraciones de PGE2entre el tratamiento y el placebo. La desnaturalización análisis de electroforesis en gel de gradiente indicó que las comunidades bacterianas fueron dispersadas al azar y no se observaron diferencias significativas entre Predilife y tratamientos con placebo. Los modelos *in vitro* mostraron aumentos similares en las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos a la observada con el ensayo *in vivo*. Para concluir, los fructanos de agave son bien tolerados en sujetos humanos sanos y aumenta el número de bifidobacterias y lactobacilos *in vitro* e *in vivo*, pero no influyen en otros productos de la fermentación.

2.11 EFECTO BIOLÓGICO *EX VIVO* DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

El grupo de investigación dirigido por la Dra. González Avila, han instalado un simulador del tracto digestivo humano, llamado ARIS (Automated System Intestinal Robotic), el cual ha sido considerado como una herramienta para evaluar productos, alimentos funcionales, alimentos e ingredientes activos. Es un sistema que simula las condiciones fisiológicas de 5 secciones del tracto gastrointestinal: estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transverso y colon descendente (Figura 2.5 y 2.6). Las regiones del colon se inoculan con microbiota intestinal de acuerdo a la población blanco. Este sistema simula los parámetros fisiológicos como el pH, tiempo de residencia, procesos digestivos (enzimas), temperatura y deglución del alimento. ARIS posee la ventaja de brindar disponibilidad de muestras tanto en volumen, tiempo y sección según se requiera. El sistema es usado para evaluar el efecto de productos sobre la microbiota a través de la simulación. El sistema fermentador múltiple (microbiota colónica) es un enfoque *ex vivo* que resuelve de forma rápida muchos interrogantes científicos, esta información puede ser útil para pruebas previas antes de ser realizadas sobre humanos (estudios clínicos o de intervención nutricional) debido a que esto define con mayor precisión los parámetros del estudio. La mayoría de los modelos se han especializado ya sea en la simulación

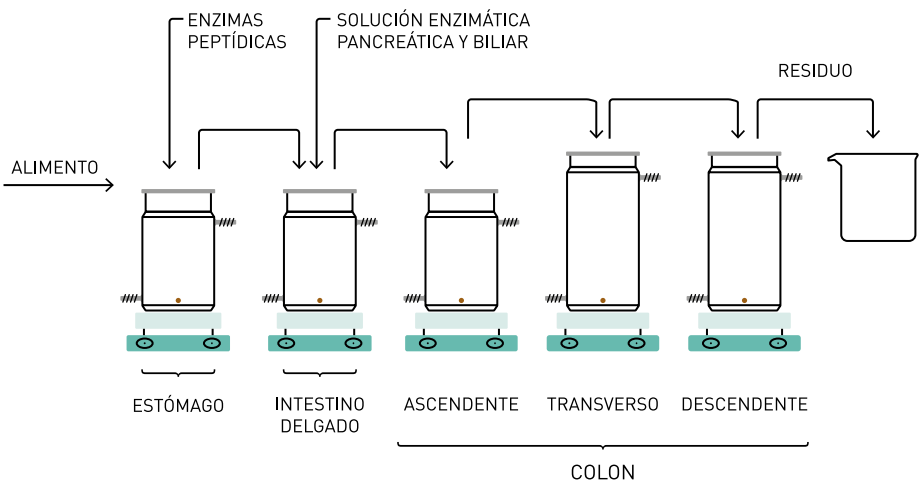


Figura 2.5 Diseño del laboratorio de digestión *ex vivo* (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.) Dra. Marisela González Ávila.

de la digestión gástrica y en el intestino delgado o en el proceso de fermentación en el colon que implica la simulación de la microbiota intestinal.

» *Función general de los reactores*

La función de los primeros dos reactores (estómago y duodeno) es la de llenado y drenado del alimento, simulando los diferentes pasos en la digestión en esta sección del TGI, esto se realiza por medio de bombas peristálticas añadiendo una cantidad definida del alimento de un reactor a otro. En la sección del intestino delgado se agregan enzimas pancreaticas y bilis, que contribuyen en el proceso de digestión de los alimentos. Posteriormente se vacían estos dos reactores tras repetitivos intervalos del paso del alimento. Los últimos tres compartimentos se agitarán continuamente, tendrán un volumen y pH constante y controlando como lo indican las condiciones de ensayo de la patente (MX/A/005418).

Figura 2.6 Sistema ARIS: A) Estómago, B) Intestino delgado, C) Colon ascendente, D) Colon transverso, E) Colon descendente, F) Reguladores de potencial de hidrógeno, G) Inyector de muestra, H) Toma de muestras. Cortesía: Ricardo García Gamboa (Instituto Tecnológico de Tepic).

2.12 INGREDIENTES ALIMENTICIOS Y PRODUCTOS

En la industria alimentaria existe una amplia tradición en el uso de inulina de achicoria y de sus fructooligosacáridos (FOS). Se utilizan como sustitutos de grasa y de azúcar, como texturizartes, humectantes, espesantes, estabilizantes de espumas y fibras solubles en concentraciones de 2 a 25%. Existe un interés actual en utilizar otras fuentes de fructanos diferentes a las de achicoria en la industria alimentaria, entre ellas las de agave. El campo de aplicación es muy amplio, tanto como para mejorar la funcionalidad de un alimento como para impartirle características que mejoren la salud del consumidor. Los prebióticos son "ingredientes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios al bienestar y la salud del hospedero" (Roberfroid, 2007). Los carbohidratos que cumplen con todos los requisitos de un probiótico son la inulina y los fructooligosacáridos de achicoria, los galactooligosacáridos y la lactulosa. Otros carbohidratos con potencial prebiótico son los xilo-oligosacaridos los isomalto-oligosacáridos, los oligosacáridos de la soya y los fructanos del agave (Roberfroid *et al.*, 2010). En lo que se refiere a estos últimos, la mayor parte de las investigaciones publicadas se basa en estudios del efecto prebiótico de los fructanos antes de incorporarlos a un alimento en específico. Este análisis es fundamental para validar cada una de las especies de *Agave* cuyos fructanos se pretenda usar en la industria alimentaria. A continuación se resaltan algunos de los trabajos más importantes.

Los prebióticos son ingredientes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos en la microbiota intestinal, confiriendo beneficios a la salud

» *Los fructanos de agave como ingrediente prebiótico*

Moreno-Vilet *et al.*, (2014) estudiaron el efecto *in vitro* de fructanos de *Agave salmiana*, sobre el crecimiento de probióticos, encontrando que aumenta las poblaciones de *Lactobacillus casei*. También demostraron que la co-administración *L. casei* y los fructanos de *A. salmiana* estimulan a las células mononucleares de sangre periférica y a linfocitos T relacionados con la defensa intestinal. Estos hallazgos abren la posibilidad para el uso de simbióticos a partir de fructanos de agave y probióticos específicos. Allsopp *et al.*, (2013) usaron un simulador del ecosistema microbiano (SHIME) para probar el potencial prebióticos de los fructanos de *A. angustifolia* Haw. Encontraron que estos fructanos estimularon significativamente el crecimiento de bifidobacterias en las regiones proximal y transversal y su fermentación produjo un aumento en los AGCC, así como una disminución de

Reactor enzimático de la planta piloto de fermentación del Centro de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (Unidad Zapopan).

la concentración de amonia en el vaso distal. Además, cuando el sobrenadante de la fermentación de estos fructanos se añadió a una monocapa de células Caco-2 se observaron efectos relacionados con un aumento en las funciones de la barrera intestinal, y otros, implicados con la protección contra el cáncer de colon.

Los estudios mencionados muestran el potencial prebiótico de los fructanos de agaves de diferentes especies. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* tanto en modelos animales, como en humanos, para corroborarlo. Existen pocos estudios con modelos animales y se han llevado a cabo principalmente con fructanos de *A. tequilana*. Por ejemplo, ratas Wistar macho que recibieron 2g diarios de fructanos de *A. tequilana* durante 24 semanas observándose un aumento en las poblaciones de bifidobacterias y de β defensinas (Minjarez-Ibañez *et al.*, 2010). Por otro lado, ratones obesos que recibieron dosis 5g de fructanos de agave con GP $<$ 10 /Kg de peso corporal mostraron reducción de peso, disminución del contenido de triglicéridos y de colesterol (Márquez-Aguirre *et al.*, 2013) y en ratones que consumieron fructanos de *A. fourcroydes* se observó un aumento en Ca y Mg en el fémur, así como una disminución en colesterol y glucosa sanguíneos. Por su parte García-Cubelo *et al.,* (2015), probaron el efecto prebiótico de los fructanos de *A. fourcroydes* en un modelo animal.

Los estudios con humanos son aún más escasos. Sin embargo, su importancia es decisiva para el uso de fructanos en la industria alimentaria ya que se relaciona

con la cantidad de fructanos que debe consumirse diariamente para que exista un efecto prebiótico sin causar efectos adversos como diarrea osmótica o flatulencia. Holscher *et al.*, (2014), determinaron que concentraciones 5 a 7.5 g/día-1 de fructanos de *A. tequilana* son bien tolerados por los humanos, mientras que Ramnani *et al.*, (2015), en un estudio con 30 voluntarios que consumieron 5g/día de fructanos de agave durante 3 semanas, observaron un aumento en las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos, sin cambios aparentes en la concentraciones de AGCC y de inmunoglobulina A (IgA). Estos resultados son comparables con la evidencia científica encontrada para fructanos lineales, como los tipo inulina de la achicoria, donde las dosis efectivas encontradas van de 4 a 5 g/día (Delzenne y Cani, 2010; Cani y *et al.*, 2005).

Un estudio de Zamora-Gasga *et al.*, (2015), se dirige específicamente a determinar el efecto prebiótico en un alimento ya desarrollado. Estos investigadores utilizaron fracciones de fructanos de *Agave tequilana* Weber como ingrediente en la formulación de una barra de granola y como resultado de una simulación de fermentación colónica, observaron que a tiempo de 12 y 24 h había un incremento en la producción de butirato y propionato de hasta 11 mmol/L, que son los principales compuestos que inducen la apoptosis en las células cancerígenas del colon. Por otro lado, el grupo de López Velázquez *et al.*, (2015) realizó un estudio doble-ciego, controlado al azar con recién nácidos (20 días ± 7 días hasta 3 meses de edad) que recibieron fórmula lácteas suplementada con fructanos de *A. tequilana* (Metlin® y Metlos®), encontrando cambios positivos en la microbiota intestinal, concentraciones de ferritina y respuesta inmune demostrando con ello, el efecto prebiótico de dichos fructanos en infantes.

Por su parte, el mercado nacional cuenta ya con varias marcas que ofrecen "fructanos nativos de *Agave tequilana* Weber var. azul" que son los únicos fructanos comercializados hasta el momento. Los principales productos son mieles y jarabes, algunos con diferentes sabores; estevia con fructanos de agave; leche de alpiste enriquecida con fructanos; una gran variedad de presentaciones de fructanos de agave en polvo para uso como fibra dietética y una línea de batidos en polvo de sabores, adicionados con fructanos. Se espera que el mercado de estos productos crezca anualmente, a medida que se conozcan mejor los beneficios de los fructanos de agave.

» *Fructanos como ingredientes con otras propiedades diferentes a la prebiosis*

Se han evaluado tanto fracciones enriquecidas de fructanos de agave de alto GP (>40), intermedio (10-30) y bajo (3-9) como fructanos nativos de agave en la formulación de productos alimenticios así como agentes protectores de compuestos termolábiles. Rodríguez-Furlán *et al.*, (2014) evaluaron fructanos nativos y fracciones de fructanos de alto, intermedio y bajo GP de *Agave tequilana* Weber obtenidos en un sistema de filtración con membranas y estabilizados

mediante secado por aspersión, como agentes lioprotectores de la proteína de plasma de bovino para evitar la desnaturalización de la proteína durante su proceso de secado y almacenamiento, teniendo como resultado una mejora en las propiedades funcionales tecnológicas, reduciendo la desnaturalización de la proteína y alargando su vida de anaquel. Ahumada Santos *et al.*, (2013) evaluaron la actividad antibacteriana y la capacidad antioxidante de extractos de 4 agaves nativos de Sinaloa, México y *A. tequilana* cultivado en esa región, encontrando que *A. tequilana* presentó la mayor actividad antibacteriana y *A. rzedowskiana* la mayor capacidad antioxidante. Otras especies tuvieron alto contenido de fitoquímicos como terpenos con potenciales aplicaciones industriales.

Los fructanos hidrolizados en concentraciones de 40-45% adoptan una textura y palatabilidad muy cercana a la de la grasa

Los estudios con fructanos de *A. tequilana* y *A. angustifolia* como sustitutos de grasa se limitan únicamente a la determinación de transición vítrea, capacidad emulsificante y estabilidad de emulsión, así como de algunas características reológicas. En este aspecto los estudios con fructanos de achicoria también van más adelantados. Cherbut (2002) evaluó el efecto de la inulina de achicoria como sustituto de grasa en productos de contenido de humedad elevada especialmente en helados y otros derivados lácteos, así como en embutidos, encontró que los fructanos hidrolizados en concentraciones de 40-45% adoptan una textura y palatabilidad muy cercana a la de la grasa, por lo que son candidatos para ser empleados como sustitutos de la grasa. Otros tuvieron resultados similares al evaluar la inulina de achicoria como sustituto de grasa en helados (Archer *et al.*, 2004). Por lo general en la formulación de un producto lácteo la tasa de reemplazo equivalente es de 0,25 g de inulina para emular 1g de grasa (Coussement, 1999) por lo que con esta sustitución se logra reducir el contenido energético de 37,6 kJ/g característico de las grasas a 2,09 kJ/g de la inulina hidratada (Murphy 2001). En embutidos se obtuvo buena aceptación sensorial cuando el sustituto de grasa representa de un 2 a un 12% del producto final, con la ventaja de obtener así reducciones de hasta 35% en el valor energético total (Cáceres *et al.*, 2004).

2.13 DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS

En el campo de desarrollo de nuevos productos la información disponible es limitada. Aunque se entiende que varias Instituciones del país se encuentran trabajando en ello, hace falta publicar los resultados ya sea como tesis o como artículos. De esta manera se lograría un mayor avance, potenciando la vinculación entre instituciones para sumar capacidades. Algunas instituciones como la Universidad Autónoma de Coahuila en conjunto con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., trabajan en el desarrollo de helados, salchichas y galletas con fructanos de *A. tequilana*. En la Universidad de Florida se estudia el desarrollo de helados usando mieles de *A. tequilana* como edulcorante. En el posgrado en alimentos del Instituto Tecnológico de Tepic se han obtenido fracciones de fructanos de agave y se están realizando tesis para evaluar capacidad estabilizante, encapsulante y efectos sensoriales y tecnológicos en diferentes alimentos.

Rubio-Ibarra (2015) evaluó las características de dos fracciones de fructanos de agave de alto e intermedio GP y su aplicación como material encapsulante en la formación de microcápsulas mediante el secador por aspersión del jugo de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) obteniendo como resultado polvos estables de ambas fracciones que protegieron al compuesto de interés durante y después del proceso de secado por aspersión, concluyendo que ambas pueden ser utilizadas como material de pared. Por su parte, González-Herrera (2016) evaluó el efecto fisicoquímico y sensorial de los fructanos de agave en comparación con inulina de achicoria como suplemento prebiótico en una matriz de manzana deshidratada, como resultado obtuvo que las mezclas de prebióticos adicionadas a la matriz generaban una sinergia mejorando las propiedades mecánicas en la dureza y apelmazamiento del polvo de manzana. Reportaron también que la adición de fructanos de agave por si sola mejoraba la textura y que tenía mayor aceptabilidad por el consumidor que la muestra control y de las demás formulaciones.

Crispín-Isidro *et al.*, (2015) desarrollaron una formulación de yogurt conteniendo fructanos de *A. tequilana* o inulina de achicoria, encontrando que estructuralmente la adición de estos fructanos mimetiza la funcionalidad impartida por la grasa, mientras que la adición de 60 $g.L^{-1}$ de fructanos de *A. tequilana* o 40 $g.L^{-1}$ de inulina de achicoria produjeron una buena aceptación sensorial en los consumidores.

2.14 NORMATIVIDAD DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE

Los fructanos de agave, son polímeros de fructosa con o sin una unidad de glucosa terminal o interna, unidas por enlaces tipo β-2,1 y β-2,6. Son conocidos comercialmente como fructanos nativos de agave o como FOS de agave, dependiendo de su perfil o grado de polimerización (GP) (PROY-NOM-002-SAGARPA-2015). Tienen en su estructura enlaces del tipo β (2-1) responsables de que no sean digestibles como lo sería cualquier carbohidrato típico, lo que a su vez tiene como consecuencia que tengan un bajo valor calórico y una funcionalidad nutricional como fibra dietética (Niness, 1999). Debido a las propiedades de los fructanos como fibra soluble, anteriormente discutidas, en la actualidad, la presencia de ciertas cantidades de fructanos en la formulación de un producto alimenticio es una condición suficiente para que dicho producto sea considerado como *"alimento funcional"*, que por definición sería aquel que contiene un componente o nutriente con actividad selectiva beneficiosa, lo que le confiere un efecto fisiológico adicional a su valor nutricional (Madrigal y Sangronis, 2007).

Con base al proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-002-SAGARPA-2015, los fructanos de agave deben cumplir las especificaciones reportadas en las Tablas 2.3 y 2.4.

TABLA 2.3 Especificaciones fisicoquímicas de fructanos nativos de agave, y FOS de agave de acuerdo al PROY-NOM-002-SAGARPA-2015.

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo	Expresado en unidades
PARA FRUCTANOS DE AGAVE			
Humedad	--	5	%
pH	5	7	unidades de pH
Cenizas	--	1	%
Sacarosa/difructosa	0.3	5	%
Glucosa	1,5	6	%
Fructosa	3	9	%
Fructanos nativos de agave	85	--	%
Manitol	--	0.15	%
Otros azúcares propios del agave	--	0.1	%
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%

Fuente: PROY-NOM-002-SAGARPA-2015.

TABLA 2.3 Continuación

Parámetro	Valor Mínimo	Valor Máximo	Expresado en unidades
Enlaces glucosídicos tipo β-2,1 como β-2,6 (unidades de fructosa terminal)	20	40	%
Enlaces glucósidos tipo β-2,1 como β-2,6 (unidades de fructosa ramificada)	10	20	%
PARA FOS DE AGAVE			
GPw 3 a 10	50	--	%
Humedad	--	5	%
pH	5	7	unidades de pH
Cenizas	--	1	%
Sacarosa/difructosa	0.3	5	%
Glucosa	1,5	6	%
Fructosa	3	9	%
Fructanos nativos de agave	70	--	%
Manitol	--	0.15	%
Otros azúcares propios del agave	--	0.1	%
Carbohidratos (incluyendo azúcares) no propios del agave	No se permite	No se permite	--
Hidroximetil Furfural	--	0.7	%

Fuente: PROY-NOM-002-SAGARPA-2015.

TABLA 2.4 Especificaciones microbiológicas para FOS, Inulina y Fructanos de agave.

Parámetro	Límites permisibles (UFC/g)	Referencia
Mohos y Levadura	100 UFC/g Máx. Máximo 100 UFC/g	NOM-210-SSA1-2014
Recuento total de microorganismos mesofílicos aerobios	2,500 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
Coliformes fecales	10 UFC/g Máx.	NOM-210-SSA1-2014
Salmonella Spp	Negativo	NOM-210-SSA1-2014
Staphylococcos	Negativo	NOM-210-SSA1-2014

2.15 PROBLEMÁTICA Y PROPUESTAS DE SOLUCIONES

Los fructanos de agave son una mezcla polidispersa, su riqueza en isómeros de fructosa aún no ha sido estudiada ampliamente para demostrar las ventajas funcionales y tecnológicas que los fructanos ramificados, *"agavinas"* tienen sobre las estructuras de fructanos lineales. Aunque en la última década se han realizado investigaciones importantes sobre efecto biológico –*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*- de los fructanos obtenidos de diferentes especies de *Agave*, es necesario realizar más estudios que permitan conocer los mecanismos de simbiosis o sinergismo que presentan la unión de los fructanos de agave y los probióticos, la dinámica de la microbiota intestinal y los beneficios generados en el hospedero que los consume como parte de su dieta.

Los fructanos de agave tienen amplias posibilidades como ingredientes funcionales en la Industria Alimentaria sobre todo como prebióticos

Los fructanos de agave tienen amplias posibilidades como ingredientes funcionales en la industria alimentaria sobre todo como prebióticos. La mayor investigación y comercialización en este campo se ha realizado con fructanos de *A. tequilana* cuyo cultivo hace más factible su utilización. Sin embargo, otras especies también presentan potencial. Por otro lado se ha reportado que tanto los fructanos nativos de agave, como sus fracciones de alto, mediano y bajo grado de polimerización, tienen propiedades tecnológicas (espesantes, emulsificantes, sustitutos de grasa) que pueden ser aprovechadas al ser incorporados a los alimentos. En los estudios sobre la caracterización de fructanos de agave, poco se ha relacionado el tipo de suelo, la madurez fisiológica, las características de la materia prima, así como el proceso de extracción. Estas variaciones repercuten en la reproducibilidad de experimentos sobre la evaluación biológica de los fructanos de agave *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, los resultados o diferencias encontradas poco pueden atribuirse categóricamente al diseño de experimentos o a las dosis utilizadas. Adicionalmente, la mayoría de los métodos analíticos disponibles para fructanos no han sido validados en fructanos de agave, ya que muchos de estos métodos fueron implementados inicialmente para fructanos tipo inulina. Por lo anterior, se requiere impulsar el desarrollo de plataformas analíticas estandarizadas y validadas que sean aplicables a fructanos de agave como ingrediente y a matrices complejas como los alimentos donde pueden ser incorporados. El proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-002-SAGARPA-2015 define el término fructanos de agave, sin embargo no se resalta su potencialidad funcional, así también presenta algunos puntos de mejora al determinar la composición misma de los fructanos de agave.

Se requieren metodologías estandarizadas y validadas relacionadas a la extracción y caracterización de fructanos de agave. Muchos de los estudios referentes a evaluaciones biológicas *in vitro* o *in vivo*, han utilizado fructanos muy variables, desde comerciales, hasta fructanos pobremente caracterizados que se extraen para usarse en esos estudios, por lo que es importante la caracterización de dichos fructanos en los estudios así como indicar el origen y la forma de extracción utilizados. Uno de los principales retos es llegar a caracterizar extractos de fructanos estandarizados de las especies silvestres y cultivadas de mayor importancia en México, en donde se cuide la trazabilidad, la madurez fisiológica de la planta, así como la estandarización en los métodos de extracción y caracterización de la materia prima. Por otro lado el reto principal es lograr una plataforma analítica estandarizada y validada para fructanos de agave. Se propone la elaboración de un manual de técnicas analíticas para fructanos de agave, así como llevar a cabo reuniones de trabajo y talleres encaminados a la homogenización de criterios de análisis y desarrollo de nuevos métodos.

Lo anterior puede lograrse en menor tiempo, si se mantiene una amplia vinculación entre universidades, centros de investigación e industrias, como lo está promoviendo la red nacional de agaves AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, la cual tiene como principal objetivo integrar y formalizar una red multidisciplinaria, enfocada al tema biotecnología de agaves y sus derivados, que fomente la colaboración y la comunicación entre sus integrantes y genere las bases de proyectos con un enfoque de mercado y con un alto impacto social, para su posterior transferencia a los sectores productivos.

2.16 CONCLUSIONES

El conocimiento profundo respecto a la composición y perfil de distribución que presentan las diferentes especies de *Agave*, así como la relación entre la estructura de los fructanos y su efecto biológico y tecnológico es indispensable. Éste permitirá generar estrategias en la creciente industria de fructanos de agave, para optimizar los procesos de extracción y estandarización de las fracciones obtenidas a fin de garantizar los beneficios que obtendrá el consumidor al incluirlos como parte de su dieta. Una solución a corto plazo es aprovechar la vinculación que ha promovido AGARED para establecer estrategias de investigación y transferencia tecnológica que permitan dar respuesta a las interrogantes y limitantes de mercado sobre la funcionalidad biológica y aplicación tecnológica que han presentado éstos como producto prebiótico a nivel internacional.

2.17 REFERENCIAS

Aguirre-Rivera J. R., Charcas-Salazar, H. & Flores-Flores, J. L. (2001). *El maguey mezcalero potosino.* San Luis Potosí, México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí/Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología.

Ahumada-Santos, Y. P., Montes-Ávila, J., Uribe-Beltrán M. J., López-Angulo, G., Vega-Aviña, R., López-Valenzuela, G., Heredia, J. B. & Delgado-Vargas, F. (2013, agosto). *Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico*. Industrial Crops and Products, 49, 143-149. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.04.050.

Aldrete-Herrera, P.I. (2013). *Separación de una fracción de fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul, con alto gp mediante filtración tangencial.* Instituto Tecnológico de Tepic. Tesis.

Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Saldaña-Oyarzábal, I. S., Gill, C. & Rowland, I. (2013, mayo). *An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from Agave angustifolia and the associated anticancer activity.* Anaerobe (22), 38-44. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.05.006.

Alvarado, C., Camacho, R. M., Cejas, R. & Rodríguez, J. A. (2014). *Profiling of commercial agave fructooligosaccharides using ultrafiltration and high performance thin layer chromatography.* Revista Mexicana de Ingeniería Química, 13 (2), 417-427.

Archer, B. J., Johnson, S. K., Devereux, H. M. & Baxter, A. L. (2004). *Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men.* The British Journal of Nutrition, 91 (4), 591-599. DOI: 10.1079/BJN20031088.

Arrizon, J., Hernandez-Moedano, A., Toksoy-Oner, E. & González-Ávila, M. (2014, septiembre). *In vitro prebiotic activity of fructans with different Fructosyl linkage for symbiotics elaboration.* International Journal of Probiotics and Prebiotics, 9 (4), 69-76.

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. & Monsan, P. (2010). *Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of Agave tequilana plants of different ages.* Food Chemistry, 122 (1), 123-130. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.028.

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. & Monsan, P. (2011). *Purification and substrate specificities of a fructanase from kluyveromycesmarxianus isolated from the fermentation process of mezcal.* Bioresource Technology, 102 (3), 3298-3303.

Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C. & López-Munguía, A. (2011). *Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans*. Food Chemistry, 129 (2), 380-386.

Ávila-Fernández, A., Rendon-Poujol, X., Olvera, C., González, F., Capella, S., Peña-Álvarez, A. & López-Munguía, A. (2009). *Enzymatic hydrolysis of fructans in the tequila production process.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (12), 5578-5585.

Baird, G. D., Lomax, M. A., Symonds, H. W., Shaw, S. R. (1980). *Net Hepatic and Splanchnic Metabolism of Lactate, Pyruvate and Propionate in Dairy Cows in vivo in Relation to Lactation and Nutrient Supply.* Biochemical Journal, 186 (1), 47-57. 10.1042/bj1860047.

Benkeblia, N. (2013, octubre). *Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops.* Journal of Chromatography A, 1313, 54-61. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.08.013.

Besteiro, S. (2004). *Calprotectina fecal.* Aplicaciones en gastroenterología. Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio (XII), 087-088.

Bhatia, I. S. & Nandra, K. S. (1979). *Studies on fructosyl tranferase from Agave americana.* Phytochemistry, 18 (6), 923-927. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)91450-X.

Bhatia, I. S., Satyanarayana, M. N. & Srinivasan, M. (1955, septiembre). *Transfructosidase from Agave vera-cruz Mill.* Biochemistry Journal, 61 (1), 171-174.

Blaut, M. (2002). *Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora.* European Journal of Nutrition, 41 (Suplemento 1), 1-16. DOI: 10.1007/s00394-002-1102-7.

Cáceres, E., García, M. L., Toro, J. & Selgas, M. D. (2004, septiembre). *The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages*. Meat Science, 68 (1), 87-96. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.02.008.

Camacho-Ruíz, R. M. & Hernandez-López, J. J. (2015). *Fructans: Another phase in understanding the wonder tree.* Tecnoagave 38, 26-31.

Canani, R. B., Costanzo, M. D., Leone, L., Pedata, M., Meli, R. & Calignano, A. (2011). *Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases*. World Journal of Gastroenterology, 17 (12), 1519-1528. DOI: 10.3748/wjg.v17.i12. 1519.

Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y. & Delzenne, N. M. (2005, mayo). *Oligofructose promotes satiety in healthy human: A pilot study.* European Journal Clinical Nutrition, 60 (5), 567-572. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1602350.

Casas-Godoy, L., Arrizon, J., Arrieta, D., Plou, F. J. & Sandoval, G. (2014, 23 al 26 de dicembre). *Production of carbohydrate fatty acid esters from Agave tequilana fructans by enzymatic acylation.* VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations and 1o Simposio Latinoamericano de Biocatalisis y Biotransformaciones. Búzios, Brasil.

Casellas, F., Borruel, N., Torrejón, A., Varela, E., Antolin, M., Guarner, F. & Malagelada, J. R. (2007). *Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin.* Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 25 (9), 1061-1067. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03288.x.

Chacón-Villalobos, A. (2006, julio/diciembre). *Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS).* Agronomía Mesoamericana, 17 (2), 265-286.

Chávez-Rodríguez, A., López-Muraira, I. G., Goméz-Leyva, J. F., Luna-Solano, G., Ortiz-Basurto, R. I. & Andrade-González, I. (2014). *Optimization of Agave tequilana Weber var. azul juice spray drying process.* Journal of Chemistry, 2014. DOI: 10.1155/2014/915941.

Cherbut, C. (2002). *Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept.* The British Journal of Nutrition, 87 (Suplemento 2), S159-S162.

Coussement, P. A. (1999, agosto). *Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status.* Journal of Nutrition, 129 (Suplemento 7), 1412s-1417s.

Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Álvarez-Ramírez, J. & Vernon-Carter, E. J. (2015, junio). *Effect of inulin and Agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt.* LWT-Food Science and Technology, 62 (1), 438-444. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.06.042.

Cummings, J. H. (1997). *The large intestine in nutrition and disease.* Danone Chair Monograph. Bruselas, Bélgica: Institute Danone.

Dávila-Céspedes, A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R., Oros-Ovalle, C., Loyola-Martínez, E. D. & Andrade-Zaldívar, H. (2014, octubre). *Protective effect of Agave salmiana fructans in azoxymethane-induced colon cancer in wistar rats.* Natural Product Communications, 9 (10), 1503-1506.

Delzenne, N., Aertssens, J., Verplaetse, H., Roccaro, M. & Roberfroid, M. (1995). *Effect of fermentable fructooligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat.* Life Science, 57 (17), 1579-1587.

Delzenne, N. M. & Cani, P. D. (2010, abril). *Nutritional modulation of gut microbiota in the context of obesity and insulin resistance: Potential interest of prebiotics.* International Dairy Journal, 20 (4), 277-280. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.11.006.

Delzenne, N. & Kok, N. (1998, junio). *Effect of non-digestible fermentable carbohydrates on hepatic fatty acid metabolism.* Biochemical Society Transactions, 26 (2), 228-230. DOI: 10.1042/bst0260228.

Delzenne, N. & Kok, N. (1999). *Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism in the rats.* Journal of Nutrition (129), 1467S-1469S.

Dorland, L., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G. & Satyanarayana, M. N. (1977, abril). *Oligosaccharides isolated from Agave vera-cruz.* Carbohydrate Research, 54 (2), 275-284. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)84818-1.

Duggan, C., Penny, M., Hibberd, P., Gil, A., Huapaya, A., Cooper, A., Coletta, F., Emenhiser, C. & Kleinman, R. (2003, abril). *Oligofructose-supplemented infant cereal: 2 randomized, blinded, community-based trials in Peruvian infants.* The American Journal Clinical Nutrition, 77 (4), 937-942.

Ehrmann, M., Muller, M. & Vogel, R. (2003, enero). *Molecular analysis of sourdough reveals Lactobacillus mindensis sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (53), 7-13. DOI: 10.1099/ijs.0.02202-0.

Evans, M., Gallagher, J. A., Ratcliffe, I., Williams, P. A. (2016). *Determination of the degree of polymerisation of fructans from ryegrass and chicory using MALDI-TOF Mass Spectrometry and Gel Permeation Chromatography coupled to multiangle laser light scattering* (53) 155-162. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.015.

Flores, J. A., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E. J., Arellano, M. & Arrizon, J. (2013, octubre). *Simultaneous saccharification and fermentation of Agave tequilanafructans by kluyveromycesmarxianus yeasts for bioethanol and tequila production.* Bioresource Technology (146), 267-273. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.078.

García, M. A. (1998). *Con sabor a maguey. Guía de la colección nacional de agavaceas y nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM.* México: Universidad Nacional Autónoma de México/Sistemas de Información Geográfica.

García-Aguirre, M., Sáenz-Álvaro, V.A., Rodríguez-Soto, M. A., Vicente-Magueyal, F. J., Botello-Álvarez, E., Jiménez-Islas, H. & Navarrete-Bolaños, J. L. (2009). *Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (21), 10205-10210.

García-Curbelo, Y., Bocourt, R., Savon, L. L., García-Vieyra, M. I. & Lopez, M. G. (2015, julio). *Prebiotic effect of Agave fourcroydes fructans: An animal model.* Food & Function, 6 (3), 177-182. DOI: 10.1039/C5FO00653H.

Gibson, G. R., Probert, H., Van Loo, J., Rastall, R. & Roberfroid, M. B. (2004, diciembre). *Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics.* Nutrition Research Reviews, 17 (2), 259-275. DOI: 10.1079/NRR200479.

Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995, julio). *Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.* The Journal of Nutrition, 125 (6), 1401-1412.

Godínez-Hernández, C., Aguirre-Rivera, J. R, Juárez-Flores, B. I, Ortiz-Pérez, M. D. & Becerra-Jiménez, J. (2016). E*xtracción y caracterización de fructanos de Agave salmiana Otto ex Salm Dick.* Revista Chapingo. Serie Ciencias forestales y del ambiente. 22(1), 59–72.

Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A. & Costabile, A. (2010, junio). *In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans.* Journal of Applied Microbiology, 108 (6), 2114-2121. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04617.x

González-Ávila, M., Prado-Ramirez, R., Flores-Montaño, F., Perez-Martinez, J., Gaspar-Ramirez, O. & Alonso-Segura, D. (2014). *Evaluation of prebiotic potential of Agave Fructans from different regions of Colima and Zacatecas, Mexico.* International Journal of Probiotics and Prebiotics, 9 (3), 93-100.

Gonzales-Fuentes, A. (2012). *Caracterización de las propiedades funcionales de fructanos de Agave para su uso como sustituto de grasa en alimentos.* Tesis de maestría no publicada. Instituto Politécnico Nacional, México.

González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., Aguilar, C. N., Ochoa-Martínez, L. A., Contreras-Esquivel, J. C., López, M. G. & Rodríguez-Herrera, R. (2016, septiembre). *Dehydrated apple matrix supplemented with agave fructans, inulin, and oligofructose.* LWT-Food Science and Technology 65, 1059-1065. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.09.037.

Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (Séptima edición). Nueva York, EE.UU.: WH Freeman and Company.

Hernández-Moedano, A., Moreno-Ramos, F., Herrera-Rodríguez, S. E. & González-Ávila, M. (2014). *Changes in intestinal microorganisms influenced by Agave Fructans in a digestive tract simulator.* Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4 (5), 19-25.

Holscher, H. D., Doligale, J. L., Bauer, L. L., Gourineni, V., Pelkman, C. L., Fahey, G. C. & Swanson, K. S. (2014, junio). *Gastrointestinal tolerance and utilization of agave inulin by healthy adults.* Food & Function, 5 (6), 1142-1149. DOI: 10.1039/c3fo60666j

Kelly, G. (2008). *Inulin-type prebiotics.* Review: Part 1. Alternative Medicine Review, 13 (4), 315-329.

Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H. J. & Blaut, M. (1997, mayo). *Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons.* American Journal of Clinical Nutrition, 65 (5), 1397-1402.

Kolida, S. & Gibson, G. R. (2007, noviembre). *Prebiotic capacity of inulin-type fructans.* The Journal of Nutrition, 137 (11), 2503S-2506S.

Kulkarni, N. & Reddy, B. (1994, diciembre). *Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt loci formation and fecal bacterial b-glucuronidase.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 207 (3), 278-283.

Lindsay, J. O., Whelan, K., Stagg, A. J, Gobin, P., Al-Hassi, H., Rayment, N., Kamm, M. A., Knight, S. C. & Forbes, A. (2006, marzo). *Clinical, microbiological, and immunological effects of fructooligosaccharide in patients with Crohn's disease.* Gut, 55 (3), 348-355. DOI: 10.1136/gut.2005.074971

Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. & Mendoza-Diaz, G. (2003). *Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (27), 7835-7840. DOI: 10.1021/jf030383v.

López-Molina, D., Navarro-Martínez, M. D., Rojas-Melgarejo, F., Hiner, A., Chazarra, S. & Rodríguez-López, J. N. (2005, junio). *Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (Cynara scolymus L.).* Phytochemistry, 66 (12), 1476-1484. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.04.00.

López-Velázquez G., Parra-Ortiz, M., De la Mora-de la Mora, I., García-Torres, I., Enríquez-Flores, S., Alcántara-Ortigoza, M. A., Ángel, A. G., Velázquez-Aragón, J., Ortiz-Hernández, R., Cruz-Rubio, J. M., Villa-Barragán, P., Jiménez-Gutiérrez, C. & Gutiérrez-Castrejón, P. (2015). *Effects of fructans from Mexican agave in newborns fed with infant formula: A randomized controlled trial.* Nutrients, 7 (11), 8939-8951. DOI: 10.3390/nu7115442.

Losso, J. W. & Hakai, S. (1997). *Molecular size of garlic FOS by matrix assisted desorption ionization mass* spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45 (11), 4342-4346.

Luo, J., Rizkalla, S. W, Alamowitch, C., Boussairi, A., Blayo, A., Barry, J. L., Laffitte, A., Guyon, F., Bornet, F. R & Slama, G. (1996, junio). C*hronic consumption of short chain fructooligosaccharides by healthy subjects decreased basal hepatic glucose production but had no effect on insulin-stimulated glucose metabolism.* American Journal of Clinical Nutrition, 63 (6), 639-645.

Macdonald, I. A., Singh, G., Mahony, D. E. & Meier, C. E. (1978, septiembre). *Effect of pH on bile salt degradation by mixed fecal culture.* Steroids, 32 (2), 245-256.

Madrigal, L. & Sangronis. E. (2007). *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 57 (4), 387-396.

Mancilla-Margalli, N. A. & López, M. G. (2006). *Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion Species.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (20), 7832-7839.

Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruiz, R. M., Arriaga-Alba, M., Padilla-Camberos, E., Kirchmayr, M. R., Blasco, J. L. & González-Ávila, M. (2013, agosto). *Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal Lactobacilli/Bifidobacteria in obese mice*. Food Funct, 4 (8), 1237-1244. DOI: 10.1039/c3fo60083a.

Mellado-Mojica, E. & López, M. G. (2012, noviembre). *Fructan metabolism in A. tequilana Weber blue variety along its developmental cycle in the field.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (47), 11704-11713. DOI: 10.1021/jf303332n.

Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. E., López, M. G. *Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of Agave tequilana Weber blue variety plants of different age.* Planta (2016) 1–17. DOI:10.1007/s00425-016-2602-7.

Michel-Cuello, C., Ortiz-Cerda, I., Moreno-Vilet, L., Grajales-Lagunes, A., Moscosa-Santillán, M., Bonnin, J., González-Chávez, M. M. & Ruiz-Cabrera, M. (2012). *Study of enzymatic hydrolysis of fructans from agave salmiana characterization and kinetic assessment.* The Scientific World Journal, 2012, 863432. DOI: 10.1100/2012/863432.

Minjarez-Ibañez, A., Segura-Ortega, J., Delgado-Rizo, V., Jave-Suarez, L. F., Gonzalez-Hernandez, L. & Fafutis-Morris, M. (2010, enero). *Prebiotic and immunologic effects of fructans from Agave tequilana Weber.* Clinical Immunology, 135, S109. DOI: 10.1016/j.clim.2010.03.325.

Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B. & Aguirre-Rivera, J. R. (2011, junio). *Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género Agave.* Agrociencia, 45 (4), 465-477.

Moreno-Vilet, L., Garcia-Hernandez, M. H., Delgado-Portales, R. E., Corral-Fernandez, N. E., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M. A. & Portales-Pérez, D. P. (2014, febrero). *In vitro assessment of agave fructans (Agave salmiana) as prebiotics and immune system activators.* International Journal of Biological Macromolecules, 63, 181-187. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.039.

Moreno-Vilet, L., Moscosa-Santillán, M., Grajales-Lagunes, A., González-Chávez, M., Bonnin-Paris, J., Bostyn, S. & Ruiz-Cabrera, M. (2013). *Sugars and fructans separation by nanofiltration from model sugar solution and comparative study with natural Agave juice.* Separation Science and Technology, 48 (12), 1768-1776.

Mukhopadhay, T., Tainsky, M., Cavender, A. & Roth, J. (1991). *Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA.* Cancer Research, 51 (6), 5270-5274.

Murphy, O. (2001, marzo). *Non-polyol low-digestible carbohydrates: Food applications and functional benefits.* The British Journal of Nutrition, 85 (Suplemento 1), S47-S53.

Niness, K. (1999). *Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose.* Cereal Foods World, 44 (2), 79-81.

Norma Mexicana-NMX. (1978) NMX-317 *que establece el método para la determinación del pH en alimentos* (NMX-F-317-S-1978).

Norma Mexicana-NMX. (2008) NMX-2008 *que establece las especificaciones del producto denominado jarabe de agave elaborado con A. tequilana Weber. Var. azul. Especificaciones y métodos de prueba* (NMX-FF-110-SCFI-2008). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de abril de 2009, México.

Norma Mexicana-NMX. (2009) NMX-2009 *que establece las especificaciones de calidad para los fructanos de agave, que se producen o comercializan en el territorio nacional, así como los métodos de prueba para verificar dichas especificaciones* (NMX-F-591-SCFI-2009). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 04 de noviembre de 2009, México.

Norma Mexicana-NMX. (2010) NMX-591 *que establece las características y especificaciones para FOS, Inulina y Fructanos de Agave que se producen o comercializan en el territorio nacional, así como los métodos de ensayo para verificar dichas especificaciones* (NMX-F-591-SCFI-2010).

Norma Mexicana-NMX. (2013) NMX-607 *que establece el método de prueba para la determinación de cenizas totales en alimentos en general y bebidas no alcohólicas* (NMX-F-607-NORMEX). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de agosto.

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1994a). NOM-111 *que establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a 25 ± 1°C* (NOM-111-SSA1-1994).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1994b) NOM-092 *que establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente* (NOM-092-SSA1-1994).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1994c) NOM-112 *que establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35°C de la muestra diluida en un medio líquido* (NOM-112-SSA1-1994).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1994d) NOM-114 *que establece un método general para la determinación de Salmonella en alimentos* (NOM-114-SSA1-1994).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1994e) NOM-115 *que establece el método microbiológico para determinar la cuenta de Staphylococcus aureus presente en alimentos nacionales o de importación* (NOM-115-SSA1-1994).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (1997) NOM-117 *que establece los métodos de prueba de espectrometría de absorción atómica para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio presentes en alimentos, bebidas, agua purificada y agua potable* (NOM-117-SSA1-1997).

Norma Oficial Mexicana-NOM. (2006) NOM-006 *que establece las características y especificaciones que deben cumplir todos los integrantes de la cadena productiva, industrial y comercial del Tequila* (NOM-006-SCFI-2005).

Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dormer, M., Belleville, M. P. (2008). *Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (Agave mapisaga) throughout the harvest period.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 3682-3687. DOI: 10.1021/jf072767h.

Patente (2012). Mx/a/2012/005418 *establece simular el proceso de la digestión de una forma que imita la fisiología del aparato digestivo humano. Implementando para ello un proceso nuevo, que permite tomar muestras en cualquier momento, sin la dependencia del uso de organismos superiores (animales).*

Pineau, L., Bonifait, L., Berjeaud, J.M., Alimardani-Theuil, P., Bergès, T., Ferreira, T. (2008). *A Lipid-mediated Quality Control Process in the Golgi Apparatus in Yeast.* Molecular Biology of the Cell, 19, 807-821. DOI: 10.1091/mbc.E07-06-0600.

Pool-Zobel, B. L. (2005). *Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: Review of experimental and human data.* British Journal of Nutrition, 93 (Suplemento 1), S73-S90. DOI: 10.1079/BJN20041349.

Praznik, W., Löppert, R., Rubio, J. M. C., Zangger, K., & Huber, A. (2013). *Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of Agave tequilana Weber, var. azul.* Carbohydrate research, 381, 64-73.

Prosky, L. & Hoebregs, H. (1999). *Methods to determine food inulin and oligofructose.* Journal of Nutrition, 129 (7), 1418-1423.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-002-SAGARPA-2015, *Relativa a las características de sanidad, calidad, inocuidad, trazabilidad, etiquetado y evaluación de la conformidad de los fructanos de agave.*

Ramnani, P., Costabile, A., Bustillo, A. G. R. & Gibson, G. R. (2015). *A randomised, double-blind, cross-over study investigating the prebiotic effect of agave fructans in healthy human subjects.* Journal of Nutritional Science, 4, e10. DOI: 10.1017/jns.2014.68.

Ravenscroft, N., Cescutti, P., Hearshaw, M. A., Ramsout, R., Rizzo, R. & Timme, E. M. (2009). *Structural analysis of fructans from Agave americana grown in South Africa for spirit production.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (10), 3995-4003.

Rendón-Huerta, J. A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Aguirre-Rivera, J. R. & Delgado-Portales, R. E. (2012). *Effects of different sources of fructans on body weight, blood metabolites and fecal bacteria in normal and obese non-diabetic and diabetic rats.* Plant Foods for Human Nutrition, 66 (5), 1-7.

Reyes-Becerril, M. I., Ascencio, F., Gracia-Lopez, V., Macias, M. E., Roa M. C. & Esteban, M. A. (2014, agosto). *Single or combined effects of Lactobacillus sakei and inulin on growth, non-specific immunity and IgM expression in leopard grouper (Mycteroperca rosacea).* Fish Physiology Biochemistry, 40 (4), 1169-1180. DOI: 10.1007/s10695-014-9913-z.

Ritsema, T. & Smeekens, S. (2003). *Fructans: Beneficial for plants and humans.* Current Opinion in Plant Biology, 6 (3), 223-230.

Roberfroid, M. B. (2007). *Inulin-type fructans: Functional food ingredients.* The Journal of Nutrition, 137 (11), 2493S-2502S.

Roberfroid, M. B. & Delzenne, N. M. (1998). *Dietary fructans.* Annual Review of Nutrition, 18 (1), 117-143. DOI: 10.1146/annurev.nutr.18.1.117.

Roberfroid, M. B., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M. & Meheust, A. (2010, agosto). *Prebiotic effects: Metabolic and health benefits*. British Journal of Nutrition, 104 (Suplemento 2), S1-S63. DOI: 10.1017/S0007114510003363.

Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Pereira, C. I., Pereira-Gomes, A. M., Malcata, F. X. & Freitas, A. C. (2011, enero). *The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices.* LWT-Food Science and Technology, 44 (1), 100-108. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.05.021.

Rodríguez-Furlán, L. T., Aldrete-Herrera, P., Pérez-Padilla, A., Ortiz-Basurto, R. I. & Campderrós, M. E. (2014, febrero). *Assessment of agave fructans as lyoprotectants of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration.* Food Research International, 56, 146-158. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.12.014.

Rubio-Ibarra, M. (2015). *Evaluación de fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul como material encapsulante del jugo de pitanga (Eugenia uniflora L.), mediante secado por aspersión.* Tesis de maestría no publicada. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit, México.

Ruiz-Alvarez, B. E., Galvez-Alvarez, N. S., Hernandez-Moedano, A., Carmona-Vargas, G. A. & González-Ávila, M. (2014). En A. Gutiérrez Mora (Ed.), B. Rodríguez-Garay, S. M. Contreras-Ramos, M. R. Kirchmayr & M. González-Ávila (Comps.). *Sustainable and integral exploitation of agave* (pp. 104-107). México: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Recuperado el 23 de noviembre de 2015 de http://www.ciatej.mx/agave/3.1agave.pdf.

Sánchez-Marroquín, A. & Hope, P. H. (1953). *Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1 (3), 246-249. DOI: 10.1021/jf60003a007.

Satyanarayana, M. N. (1976a, septiembre). *Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in Agave vera-cruz: Part I. Properties of a partially purified transfructosylase.* Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 13 (3), 261-266.

Satyanarayana, M. N. (1976b, diciembre). *Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in Agave vera-cruz: Part II. Biosynthesis of oligosaccharides.* Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 13 (4), 398-407.

Satyanarayana, M. N. (1976c, diciembre). *Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in Agave vera-cruz: Part III. Biosynthesis of fructans.* Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 13 (4), 408-412.

Segain, J. P., De la Blétiére, D. R., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H. & Galmiche, J. (2000, septiembre). *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkB inhibition: Implications for Crohn's disease.* Gut, 47 (3), 397-403. DOI: 10.1136/gut.47.3.397.

Srinivasan, M. & Bhatia, I. S. (1953, septiembre). *The carbohydrates of Agave vera-cruz Mill.* Biochemistry Journal, 55 (2), 286-289.

Srinivasan, M. & Bhatia, I. S. (1954, febrero). *The carbohydrates of Agave vera-cruz Mill.* 2. Distribution in the stem and pole. Biochemistry Journal, 56 (2), 256-259.

Suzuki, M. (1993). *History of the fructan research.* En M. Suzuki & N. J. Chatterton (Eds.), *Science and technology of fructans.* Boca Raton, FL, EE.UU.: CRC Press.

Urías-Silvas, J. E., Cani, P. D., Delmée, E., Neyrinck, A., López, M. G. & Delzenne, N. M. (2008, febrero). *Physiological effects of dietary fructans extracted from Agave tequilana Gto. and Dasylirion spp.* British Journal of Nutrition, 99 (2), 254-261. DOI: 10.1017/S0007114507795338.

Urías-Silvas, J. E. & López, M. G. (2009). *Agave spp. and Dasylirion spp. fructans as a potential novel source of prebiotics.* Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology, 3 (1), 59-64.

Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Campos-Mendiola, R., Jiménez-Aparicio, A. R. & Arenas-Ocampo, M. L. (2014). *Prebiotic potential of Agave angustifolia Haw fructans with different degrees of polymerization.* Molecules, 19 (8), 12660-12675. DOI: 10.3390/molecules190812660.

Waleckx, E., Mateos-Diaz, J. C., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., Brin, N., García-Quezada, G. & Monsan, P. (2011). *Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production.* Food Chemistry, 124 (4), 1533-1542.

Wang, N. & Nobel, P. S. (1998). *Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species Agave deserti.* Plant Physiology, 116 (2), 709-714.

Wang, Y. (2009, enero). *Prebiotics: Present and future in food science and technology.* Food Research International, 42 (1), 8-12. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.09.001.

Zamora-Gasga, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J. & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015, marzo). *In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars.* LWT-Food Science and Technology, 60 (2), 766-772. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.032.

Zúñiga-Partida, V., Camacho-López, A. & Martinez-Gómez, A. J. (Inventores). (1997). *Method of producing fructose syrup from agave plants.* Publicación: WO 97/34017.

3. BEBIDAS TRADICIONALES Y NUEVAS ALTERNATIVAS

PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO
Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

SECCIÓN I. BEBIDAS REFRESCANTES Y ALCOHÓLICAS DE AGAVE

Moreno-Terrazas, R., Escalante A., Verdugo-Valdez, A.G., De la Rosa, M., Ortiz Basurto, R.I., Orantes-García, C., Palafox-González, L., Castro Díaz, A. S., Lappe-Oliveras, P.

RESUMEN

Actualmente diferentes especies de *Agave* son explotadas para la producción de bebidas refrescantes (agua de lechuguilla), alcohólicas (pulque), y destiladas de aguamiel (licor comiteco) o de mostos de agave (mezcal, tequila, bacanora y raicilla, por mencionar algunas) que tienen reconocimiento nacional e internacional. En esta primera sección del capítulo 3 se describen y definen varias bebidas fermentadas y destiladas de aguamiel y se incluye información relevante sobre su historia, proceso y áreas de producción, nivel de producción y comercialización, especies de Agave utilizadas en su elaboración, estado actual del conocimiento, problemática específica, su industrialización, retos tecnológicos y perspectivas.

Palabras clave: *Agave, aguamiel, bebidas fermentadas y destiladas, agua de lechuguilla, pulque, comiteco, microorganismos, industrialización.*

3.1 INTRODUCCIÓN

En México existe una gran diversidad de agaves o magueyes que a través de los siglos han tenido una gran importancia biológica, ecológica y económica.

En los tiempos antiguos el uso integral de estas plantas fue de tal importancia, que el establecimiento, supervivencia y desarrollo cultural de diferentes grupos humanos en Mesoamérica y Oasis-América no se podría explicar sin su existencia (Fournier-García y Mondragón-Barrios, 2012; García-Mendoza, 1995; 1998; Lappe-Oliveras et al., 2008).

Hace alrededor de unos 10,000 años que estas plantas han sido explotadas con fines diversos, siendo uno de éstos la producción de bebidas alcohólicas. En México, las bebidas alcohólicas tradicionales han tenido un papel importante en la vida cotidiana de las comunidades indígenas. Desde la época prehispánica, las civilizaciones mesoamericanas fermentaron una variedad de plantas nativas, entre ellas diversas especies de Agave, para la producción de bebidas alcohólicas, cuyo consumo tuvo una gran relevancia ceremonial, religiosa, de adivinación y medicinal durante milenios (Bruman, 2000).

El agua de lechuguilla es una bebida refrescante, elaborada de forma artesanal en el sur del estado de Jalisco, Nayarit y Sinaloa, con las piñas troceadas de Agave inaequidens, y que se comercializa popularmente en la calle o en tiendas de autoservicio.

Se conserva hasta por cuatro meses si se mantiene en lugares frescos y contiene una gran variedad de bacterias lácticas, propiónicas y levaduras como microorganismos involucrados en su fermentación. Presenta algunos problemas como la disponibilidad, la adulteración y la competencia por la materia prima, ya que con este maguey también se elabora la bebida destilada denominada "*raicilla*".

El pulque es una bebida prehispánica que ha subsistido hasta nuestros días, por lo que es considerada la más tradicional y un ícono de México (Gonçalves-de Lima, 1978, 1990; Loyola-Montemayor, 1956). Es obtenido por la fermentación espontánea del aguamiel o savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros (principalmente *Agave salmiana*, *A. americana* y *A. mapisaga*, que crecen en las zonas semiáridas y templadas del Altiplano central de México), aunque actualmente también se elabora en pequeña escala industrial utilizando cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas y levaduras, y controlando la calidad e inocuidad del producto envasado (Escalante *et al.*, 2012; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2004; Sánchez-Marroquín, 1967; Steinkraus, 1996).

Por su gran importancia histórica, religiosa, social, médica y económica, el pulque es la bebida más ampliamente estudiada bajo diferentes puntos de vista desde la época colonial. Actualmente el pulque persiste como una bebida típicamente popular; sin embargo, desde hace algunas décadas ha tomado importancia su producción a micro escala industrial mediante un proceso controlado que emplea aguamiel sin fermentar el cual se inocula con iniciadores que aseguren la calidad y estabilidad del producto.

Por su parte, el licor comiteco es una bebida que se obtiene de la fermentación y destilación del aguamiel de *Agave americana* mezclado con piloncillo y agua, en la Meseta Comiteca del estado de Chiapas. La bebida tiene importancia cultural y social en la región y ha alcanzado cierta relevancia estatal y nacional gracias a la comercialización realizada por una empresa protegida bajo la marca "*Chiapas*".

3.2 AGUA DE LECHUGILLA

3.2.1 INTRODUCCIÓN

El agua de lechuguilla es una bebida refrescante, tradicional mexicana, de bajo contenido alcohólico (<1%). Se elabora principalmente según algunos registros, en distintos municipios del sur del estado de Jalisco, en Nayarit y en Sinaloa, y que se vende envasada en bolsas de plástico termo-selladas, en lugares callejeros y tiendas de autoservicio.

El agua de lechuguilla es una bebida refrescante, tradicional mexicana, de bajo contenido alcohólico (<1%)

3.2.2 DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN

Es una bebida de fermentación prolongada que se elabora en el sur de Jalisco generalmente a partir de *Agave lechuguilla* o lechuguilla (*A. inaequidens*), aunque probablemente otras especies pueden ser utilizadas en su proceso de elaboración, ya que el término lechuguilla se emplea en dichas regiones para denominar cualquier maguey de hojas anchas. El uso de *A. inaequidens* en las regiones mencionadas está destinado también a la producción de otra bebida regional destilada que se conoce con el nombre de "*raicilla*", que es un tipo de mezcal que sólo se produce en estas comarcas de Jalisco, por lo que se genera una competencia por la utilización de este recurso vegetal para la elaboración de cualquiera de las dos bebidas.

3.2.3 HISTORIA DE LA BEBIDA

No existe información fidedigna de cuándo se empezó a elaborar la bebida, pero el aprovechamiento de *A. inaequidens* para obtener el agua de lechuguilla y la raicilla en el estado de Jalisco, data al parecer desde el siglo XV. Sólo a partir de la segunda mitad del siglo XX se ha empezado a producir y a comercializar el agua de lechuguilla de forma envasada al igual que la raicilla.

En la región de Jalisco donde crece *A. inaequidens* se ha reportado la existencia de otras especies de *Agave* a las que se designa también como "*lechuguillas*", por lo que es factible que algunas de éstas se empleen también en la elaboración del agua de lechuguilla (Vázquez-García, 2007).

Normalmente el agua de lechuguilla, al igual que la raicilla, se hace con plantas silvestres, lo que está afectando las poblaciones naturales de este recurso debido a una sobre-explotación, aunado al largo ciclo de vida de la planta, que demora entre 8 y 27 años en alcanzar la madurez, a la incidencia de plagas y enfermedades, a su cosecha prematura, a la baja cantidad de hijuelos producidos por año (1-2), y a que no siempre llega a formar

semillas, o si las forman, muchas veces no son viables ya que están expuestas a condiciones ambientales adversas. El recurso está en peligro y empieza a haber en la actualidad una escasez de magueyes para producir ambas bebidas. Por estas razones y debido a que se espera que haya una mayor demanda de raicilla, algunas personas han empezado a incrementar los cultivares de lechuguilla a partir de hijuelos, pero principalmente destinados a la producción de raicilla y no agua de lechuguilla.

3.2.4 INFORMACIÓN TÉCNICA GENERAL

» *Proceso de elaboración*

La forma de preparación de la bebida según algunos productores se hace de la siguiente manera: se seleccionan magueyes maduros de *A. inaequidens* u otras especies a las que en la región de Jalisco se les denomina también lechuguillas; a éstas se les cortan las hojas con el objeto de dejar totalmente expuesto el tallo de la planta o piña. Las piñas se cortan en trozos de 20 a 30 cm, se lavan, se colocan en cubetas de plástico y se les adiciona agua potable; las cubetas se tapan y se ponen a fermentar durante 10 a 15 días, aunque en algunos lugares, donde la temperatura varía entre 10 y 30°C, la fermentación puede prolongarse hasta por más de tres meses. Pasado ese tiempo, el líquido fermentado se cuela con una manta de cielo y se colecta en un nuevo recipiente donde se adiciona más agua y azúcar; el recipiente se tapa y se deja fermentar nuevamente durante dos a tres semanas, el proceso se puede controlar dependiendo del desplazamiento del producto. Después de este lapso, el líquido fermentado se vuelve a diluir y se le ajusta el dulzor, ya que la bebida no debe ser muy dulce. La bebida ya lista, se envasa en bolsas de plástico, que por tradición suelen ser de color verde, de forma rectangular o cuadrada, en presentaciones que varían de 250, 500 o hasta 1000 mL las cuales se termosellan. El color verde claro de las bolsas por un lado protege el producto de la luz, y por el otro, se ha vuelto característico para identificar el producto. Las bolsas se empacan y se almacenan en un lugar fresco sobre costales de ixtle mojado y se tapan con el mismo material; esta acción permite que se conserven hasta su venta o distribución. El producto puede conservarse hasta por cuatro meses en esas condiciones y no requiere refrigeración.

Los trozos de piñas pueden volver a fermentarse y ser utilizadas como materia prima de la bebida durante dos o tres fermentaciones consecutivas; pasado este tiempo se desechan. El producto es ligeramente ácido y un poco pungente, no muy dulce y muy refrescante, y no se detecta ningún sabor a alcohol; puede ser natural o bien adicionado con algún sabor natural o artificial lo que permite diversificar el mercado. Sin embargo, el más tradicional se comercializa sin agregar saborizante alguno.

Desgraciadamente existen algunas empresas que en lugar de hacer el producto fermentado adicionan simplemente azúcar y sabor y lo comercializan como agua de lechuguilla, sin asemejarse al fermentado tradicional.

3.2.5 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Lappe-Oliveras *et al.*, (2011) realizaron un estudio durante la elaboración de agua de lechuguilla en una fábrica en el municipio de El Grullo en Jalisco, con el objetivo de determinar la diversidad microbiana y el comportamiento químico a lo largo de la fermentación. Se observó que las poblaciones microbianas de bacterias acidófilas (lácticas, acéticas y propiónicas), de enterobacterias, de levaduras y de mohos permanecían bajas a lo largo de la fermentación; ninguna especie de *Zymomonas* fue detectada durante la fermentación. Sólo en una de las piñas y en el fermento más joven se encontraron levaduras en concentraciones hasta de 2.2 y 12.2 x 10^6 UFC/g o mL de muestra, respectivamente; de las bacterias acidófilas se tuvieron poblaciones no mayores a 10^3 UFC/g o mL y hubo menos de 10^2 UFC/g o mL de muestra de enterobacterias. Los mohos estuvieron entre 10^2 y 10^3 UFC/g o mL de muestra y sólo en el producto final fueron menores a 10^2.

En las aguas ya fermentadas, así como en los filtrados fue donde mayor variedad microbiana se detectó, siendo las levaduras y las bacterias lácticas las más diversas. Las especies de levaduras identificadas a lo largo de la fermentación fueron: *Saccharomyces cerevisiae, Pichia membranifaciens, Torulaspora delbruekii, Pichia kudriavzevii, Zygosaccharomyces* spp., *Candida norvegica, C. magnolia, C. globosa, C. tropicalis*, y las especies de bacterias lácticas *Lactobacillus acidophilus, L. brevis, L. curvatus y L. lidneri* entre otras, tales como bacterias acéticas de los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*. Las levaduras *Kloeckera apiculata, K. japonica* y *Cryptococcus humicola* estuvieron presentes en el producto final. En las piñas y los productos envasados se aislaron también bacterias del género *Propionibacterium*. De todos los microorganismos identificados se estableció que las levaduras *S. cerevisiae* y diferentes especies de *Zygosaccharomyces*, las bacterias propiónicas, las lácticas y las acéticas se mantienen en todo el proceso de fermentación y en el producto final, aunque en éste la diversidad disminuye.

La mayor proporción de ácidos láctico y acético y el menor pH se reportaron en los fermentos y en los filtrados llegando a tener hasta más de 1% de cada uno de los ácidos y un pH menor a 3; en el producto final los ácidos disminuyeron y el pH se incrementó de forma ligera debido probablemente a que el producto se diluyó antes de ser envasado. Los compuestos volátiles identificados correspondieron principalmente a aldehídos, cetonas, ácidos grasos y diferentes alcoholes, siendo todos ellos el resultado del metabolismo de una microbiota muy diversa. Debido a la presencia de esta diversidad de compuestos el agua de lechuguilla es muy particular en características sensoriales, y tal vez la presencia de las bacterias propiónicas produzcan el ácido propiónico capaz de conservar el producto sin refrigeración durante tiempos prolongados (Lappe-Oliveras *et al.*, 2011).

3.2.6 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

El principal problema que enfrenta la bebida es que, al ser un producto de consumo popular, está siendo desplazado del mercado por una gran variedad de bebidas; además, al ser comercializado en la calle se tiene la idea de que no es un producto higiénico. Adicionalmente, existe en la actualidad el comercio de bebidas *"tipo agua de lechuguilla"* que únicamente se saborizan artificialmente y se comercializan como el producto original, sin cumplir con las especificaciones de un producto fermentado de agave y que se comercia como si lo fuese, generando una competencia desleal hacia la bebida tradicional fermentada.

... al ser un producto de consumo popular (la lechuguilla), está siendo desplazado del mercado por una gran variedad de bebidas

Por estas razones es necesario emprender una campaña que permita difundir que es una bebida fermentada de diferentes especies de *Agave* denominados lechuguilla, que tiene características que le permiten conservarse en un ambiente fresco durante un tiempo prolongado, y que además puede ser considerada como un producto fermentado tradicional de agave, típico de nuestro país.

Otro problema que enfrenta la producción de la bebida, al igual que otras elaboradas con agaves, es la obtención de la materia prima. Los agaves que se usan normalmente son los que se colectan en el campo y que crecen de forma natural cerca de las zonas de producción, si el maguey fuese utilizado únicamente para producir el agua de lechuguilla se podría seguir manejando el recurso sin sobreexplotarlo; sin embargo, al emplearse también en la elaboración de la raicilla las plantas silvestres empiezan a agotarse, por lo que para manejar este recurso vegetal se presentan muchos de los problemas que ya existen también con otras especies de *Agave* de las cuales se generan diferentes productos (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

El problema más común que empiezan a enfrentar los productores de lechuguilla y raicilla al querer reproducir plantas de forma controlada mediante hijuelos, bulbilos o semillas, es que *A. inaequidens* así como otras especies de *Agave* utilizadas en la elaboración de las bebidas, sólo produce por planta uno o dos hijuelos al año, y si forma semillas, éstas por lo general son escasas y poco viables. A la fecha no existe un programa para producir semillas de esta especie de *Agave*. La especie presenta un tiempo de maduración largo, que puede tardar desde 8 hasta 27 años, por lo que se convierte en una especie en peligro (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008).

3.2.7 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS DEL AGUA DE LECHUGUILLA

Es necesario que se identifiquen las posibilidades del aprovechamiento integral de los magueyes utilizados para producir ambas bebidas, con la finalidad de incrementar su producción sin que exista conflicto por la materia prima.

Además deben realizarse más estudios que permitan corroborar la estabilidad y vida de anaquel del agua de lechuguilla, y establecer si esto se debe a la producción del ácido propiónico solo o a la combinación con los ácidos láctico y el acético que se producen durante la fermentación, así como determinar la prevalencia de los diferentes grupos microbianos que participan en la fermentación de la bebida y en la generación de diversos compuestos que impactan en las características sensoriales de la misma.

Deben realizarse más estudios que permitan corroborar la estabilidad y vida de anaquel del agua de lechuguilla

También sería adecuado precisar si el agua de lechuguilla, al ser un producto derivado de diferentes especies de *Agave*, principalmente *A. inaequidens*, puede tener propiedades funcionales o nutrimentales como es el caso del pulque y del aguamiel. Esto permitiría introducirla en nuevos nichos de mercado como una bebida orgánica y funcional.

Se debe asegurar también que se cumpla con las especificaciones sanitarias que avalen siempre la inocuidad del producto.

3.2.8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Faltan más estudios que permitan definir y promover todas las características del agua de lechuguilla, y establecer el aprovechamiento integral de *A. inaequidens* y de otras especies que permitan producir dos bebidas diferentes, una el agua de lechuguilla y otra la raicilla, como base para empezar a generar el aprovechamiento integral del recurso en esa región en apoyo principalmente a los pequeños productores.

3.3 EL PULQUE: BEBIDA ANCESTRAL QUE PERDURA HASTA LA ACTUALIDAD

A. Maguey castrado
B. Raspado del cajete
C. Aguamiel
Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.

3.3.1 INTRODUCCIÓN

El pulque es probablemente la bebida alcohólica mexicana más antigua y tradicional. Es una bebida blanca, viscosa, ligeramente ácida y alcohólica que se produce por fermentación del aguamiel o savia azucarada que se extrae de varias especies de magueyes pulqueros, principalmente *Agave salmiana*, *A. americana* y *A. mapisaga*, que crecen en las zonas semiáridas y templadas del Altiplano central de México, en suelos pobres, con escasas e irregulares precipitaciones, heladas tempranas o sequía (García-Mendoza, 1995, 1998; Gonçalves-de Lima, 1990; Sánchez-Marroquín, 1967; Soberón Mora, 1998).

Por su gran importancia histórica, religiosa, social, médica y económica, el pulque es la bebida más ampliamente estudiada desde diferentes puntos de vista desde la época colonial (Backstrand *et al.*, 2002; Correa-Ascencio *et al.*,

2014; Escalante *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2016; Gonçalves-de Lima, 1990; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Morales de León *et al.*, 2005; Parson y Darling, 2000; Ramírez-Rancaño, 2000; Ramírez-Rodriguez, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; De Sahagún, 2003).

En el México prehispánico, el pulque tuvo una presencia dominante en la vida cotidiana de las diversas comunidades indígenas, así como una influencia decisiva en la religión, los rituales de adivinación, de guerra y curación. Esto se ha ilustrado en los códices prehispánicos (mexicano, tlaxcalteca, mixteca y maya) y post-hispanos que se conservan hasta la actualidad (Gonçalves-de Lima, 1978).

El pulque persiste hoy como una bebida típicamente popular cuyo consumo varía con la edad y el tipo de consumidor, así como con la ocasión. Sin embargo, desde hace algunas décadas ha tomado importancia la producción a micro escala industrial a través de un proceso controlado que emplea aguamiel sin fermentar el que se inocula con iniciadores asegurando así la calidad, inociudad y estabilidad del producto (Ramírez *et al.*, 2004; Steinkraus, 1996).

En esta sección se exponen varios temas con el fin de presentar una visión amplia de lo que es el pulque y su industria. Inicialmente, se relata una breve historia de la bebida desde su descubrimiento en la época prehispánica hasta nuestros días. Se describen las diferentes especies de magueyes utilizadas para su producción, su distribución real y su densidad. También se presenta en detalle el proceso tradicional e industrial de elaboración de la bebida, y se describen los principales cambios microbianos, bioquímicos, nutrimentales y funcionales que ocurren en los procesos de fermentación espontánea y controlada. Para concluir esta sección se presentan varias alternativas y perspectivas para mejorar la industria del pulque, con la visión de dar un aprovechamiento integral sustentable del maguey pulquero en beneficio principalmente de los pequeños productores.

3.3.2 DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN DEL PULQUE

El pulque es la bebida alcohólica prehispánica que ha perdurado hasta nuestros días, por lo que es considerada una de las más antiguas, la de mayor tradición y un ícono de México. Blanca, viscosa, ácida (pH 3.5 a 4.3), ligeramente alcohólica (4-7% de etanol). Esta bebida se obtiene por fermentación del aguamiel, o savia azucarada que se extrae de varias especies de magueyes pulqueros del género *Agave*, principalmente *A. salmiana* (maguey pulquero, manso o verde), *A. mapisaga* (maguey pulquero, de manos largas o mexicano) y *A. americana* (maguey pulquero), y en menor proporción de *A. inaequidens* (maguey hoeimetl), *A. hookerii* (maguey ixquitécatl o pulquero) y *A. marmorata* (maguey tepeztate) (García-Mendoza, 1995, 1998).

Dichas especies crecen en una amplia región con clima árido, semiárido o templado, con suelos arenosos, pobres, bien drenados y precipitaciones escasas e irregulares. El cultivo de maguey tradicionalmente ha sido utilizado para prevenir la erosión del suelo, y se les encuentra como un monocultivo protegiendo o delimitando hogares y tierras agrícolas (García-Mendoza, 1995; Gobierno

del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares, 1988; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Loyola-Montemayor, 1956; Ortiz-Basurto *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2004; Steinkraus, 1996).

3.3.3 HISTORIA DEL PULQUE

Los antiguos mexicas denominaban a esta bebida con diferentes nombres según el tipo; *iztacoctli* al pulque blanco, *metoctli* al vino de maguey; *necoctli* al pulque dulce ligeramente fermentado; *teoctli* a la bebida ceremonial o de los dioses. Al *metoctli* en proceso de descomposición o putrefacción y que adquiría sabor y olor desagradable fue llamado *poliuhquioctli*, vocablo que derivó a la palabra pulque, que fue adoptada por los españoles para designar al vino de maguey o *metoctli* recién preparado (Cabrera, 1974).

La coexistencia del hombre mesoamericano y las plantas de agave prevalece desde hace miles de años. Registros antiguos señalan que hacia el año 6500 a.C. los habitantes de Tehuacán, Puebla ya cultivaban distintas especies de magueyes, las cuales han sido explotadas desde entonces para la obtención de alimento, bebida, vestimenta, fibra, material de construcción, medicina, entre otros usos.

Con base en estos registros y en evidencias arqueológicas halladas en Tula, Tulancingo y Teotihuacán, donde se han encontrado raspadores semejantes a los utilizados actualmente para raspar los magueyes, así como por las representaciones pictóricas de la bebida y de sus usos plasmados en los murales de Tepantitla en Teotihuacán (250-300 d.C.); en el Mural de los Bebedores de Pulque (200 d.C.) del Patio de los Altares en la pirámide de Cholula; y en los tableros del juego de pelota sur en el Tajín (300 a. C. a 900 d.C.), varios historiadores consideran que el pulque es una de las bebidas alcohólicas más antiguas de México, y que probablemente fueron los antiguos otomíes los primeros en elaborarla hacia el año 2000 a.C. quienes posteriormente heredaron el conocimiento para la elaboración de la bebida a otras culturas del Altiplano central (Blomberg, 2000; Diguet, 1928; Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares, 1988; Martín del Campo, 1938; Sánchez-Marroquín, 1949).

En el México antiguo el pulque fue conocido desde la Huasteca hasta el norte de Yucatán, y tuvo gran importancia en la vida diaria y ceremonial de varios pueblos indígenas, principalmente del centro de México (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Ulloa *et al.*, 1987). La relevancia del pulque en la vida de los aztecas y de otros pueblos está ilustrada en los códices pre y poshispánicos que resistieron las destrucciones del tiempo y del hombre después de la Conquista (Gonçalves-de Lima, 1978; Vallejo, 1992).

Con la caída del Imperio Azteca el pulque perdió su importancia dentro de los rituales religiosos, aunque su papel como alimento, medicina y sustituto de agua no desapareció. En los primeros años de la Conquista, los españoles promovieron el consumo generalizado de pulque, que se volvió una bebida profana y popular. Durante la época colonial las ciudades de México y Puebla se convirtieron en los principales centros de consumo (Álvarez, 1987; Corcuera-de Mancera, 1977; Soberón Mora, 1998).

Vaciado del aguamiel, a través de una cedazo, a la tina de fermentación. Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.

Durante la época colonial la industria pulquera fue una de las actividades económicas más importantes que alcanzó un gran auge hacia finales del siglo XVIII, sin embargo, esta actividad se vio interrumpida durante el movimiento armado independentista de 1810. A lo largo del siglo XIX esta actividad resurgió consolidándose nuevamente debido a la introducción del ferrocarril y con el desarrollo de grandes haciendas pulqueras, como San Antonio Ometusco, San Juan Tlacatecpan, Venta de Cruz, Zuapayuca, en el Estado de México; Arcos, Espejel, Chavarría, Santa María Tecajete, San Lorenzo, Tetlapayac, en Hidalgo; Ixtafiayuca, San Bartolomé del Monte, San Lorenzo Soltepec, en Tlaxcala, dedicadas al cultivo del maguey, la producción del aguamiel y la elaboración del pulque, productos que eran enviados a las grandes ciudades como México y Puebla para su venta (Monterrubio, 2007). Estas organizaciones agronómicas prosperaron y se convirtieron en agroindustrias que generaron grandes fortunas hasta el siglo XX bajo el amparo del gobierno porfirista.

A principios del siglo XVIII los centros de producción de pulque estaban localizados en las regiones áridas del norte, pero al final de periodo colonial algunas de las zonas más productivas en el Valle de México fueron las tierras fértiles de Cuautitlán, Chalco, Tlalmanalco, Amecameca y Otumba, en el Estado de México, y en las localidades de Iztapalapa y Xochimilco al sur de la Ciudad de México. También en los actuales estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, San Luis

Potosí, Coahuila, Querétaro, y Michoacán, grandes extensiones de tierra se dedicaron al cultivo del maguey (Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares, 1988).

En el siglo XX la industria del pulque se vio nuevamente interrumpida durante el movimiento revolucionario de 1910 (Soberón-Mora, 1998). Este movimiento no eliminó la industria pulquera por completo, sino que fueron otros factores como la introducción de la industria cervecera, cuestiones políticas en contra del gobierno porfirista y de las agroindustrias amparadas por este régimen, la reforma agraria y las campañas anti-alcohólicas y de desprestigio hacia pulque, lo que gradualmente contribuyó en la disminución del gusto por la bebida.

Actualmente el pulque permanece como una bebida popular; prácticamente ha desaparecido del mercado urbano...

Hasta 1945 la producción de pulque aumentó gradualmente, como resultado de la explotación excesiva de los cultivos de maguey de las ex haciendas pulqueras. Sin embargo, la mínima replantación y un sistema de cultivo inadecuado, afectó la existencia de magueyes e incrementó los problemas de la industria pulquera (Loyola-Montemayor, 1956; Ramírez-Rancaño, 2000).

Preocupados por esta situación el gobierno creó el Patronato del Maguey que en 1980 fue subrogado a la Promotora del Maguey y el Nopal, cuyo propósito era explotar de forma integral y sustentable las plantas de maguey, producir pulque higiénico de calidad homogénea, optimizar el envasado y transporte de la bebida, y desarrollar nuevos productos con el fin de incrementar el ingreso de los campesinos. A pesar de lo anterior este intento de producir una bebida higiénica y estable, semejante al pulque, que fue comercializada con la marca "*Magueyin*", fracasó de la misma forma como sucedió en la primera mitad del siglo XX con otras marcas envasadas de pulque [Crespomel Pat. Mex. No. 34441 (1933); Miel-Mex Pat. Mex No. 45053 (1945); Jícara Pat. Mex. No. 56023 (1954)] que al carecer de las características distintivas del producto tradicional no fueron aceptadas por el consumidor habitual de la bebida (Ramírez *et al.*, 2004; Ramírez-Rancaño, 2000; Sánchez Marroquín, 1967, 1977, 1979; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Steinkraus 1996).

Actualmente el pulque permanece como una bebida popular; prácticamente ha desaparecido del mercado urbano y sólo se comercializa en pulquerías, pulcatas, y restaurantes de comida mexicana. En poblaciones rurales cercanas a las zonas de producción, el pulque es aún la bebida estimulante preferida, además de que forma parte de su dieta diaria y en ocasiones es un sustituto de agua. Algunas personas aún producen la bebida para autoconsumo (Bennet *et al.*, 1998, Escalante *et al.*, 2012; Ramírez-Rancaño, 2000).

En el México contemporáneo se están haciendo importantes esfuerzos para luchar contra la desaparición de la bebida. Se está promoviendo el consumo de pulque fino de la mejor calidad en restaurantes de cocina mexicana, festivales gastronómicos, y en viejas pulquerías de tradición, así como su incorporación en la nueva gastronomía mexicana con el fin de rescatar esta bebida ancestral, un elemento importante de nuestra cultura (Poblet, 1995).

3.3.4 INFORMACIÓN TÉCNICA GENERAL DEL PULQUE

» *Cultivo del maguey*

El maguey es una planta relativamente fácil de cultivar. Su propagación puede ser realizada trasplantando brotes jóvenes que crecen alrededor de plantas adultas, a los que se les llama "*matecuates*". Una planta adulta puede generar hasta 50 *matecuates*. Los brotes son trasplantados normalmente en la temporada de lluvias a una nueva magueyera o plantación para producción de aguamiel, en donde son plantados en líneas paralelas llamadas "*melgas*" o "*metepantle*" (pared de magueyes), separados con una distancia de 2 a 5 m. Alternativamente, las semillas de agave pueden ser germinadas en soportes en invernaderos bajo condiciones controladas (Monterrubio, 2007).

» *Proceso de elaboración del pulque: elaboración tradicional*

El sustrato del cual se produce el pulque es la savia del maguey pulquero o aguamiel. Ésta se extrae de plantas maduras de 8 a 10 años de edad que están a punto de producir la inflorescencia. Las plantas maduras son capadas o castradas, con el fin de eliminar el brote o el cogollo floral. Esta operación generalmente es realizada a inicios de la primavera o en la última parte del otoño, aunque en algunas plantaciones se puede realizar en cualquier época del año, dado que el maguey ya presenta las características antes mencionadas. La planta castrada se deja añejar por un periodo de 6 meses a un año, lo que permite la maduración de las hojas centrales y el aumento en el contenido de azúcares del aguamiel. Una vez iniciada la producción de aguamiel el ciclo productivo normal de la planta puede ser de 90 hasta 180 días, con una producción aproximada de entre 200 a 1000 L o más de savia, que contiene de 7 a 14% de azúcares, lo que depende de la variedad de maguey y de las condiciones de cultivo. El volumen de aguamiel que se produce varía a través del período de cosecha; al principio la planta puede producir hasta 0.4 L/día, cantidad que se incrementa hasta alcanzar 4 o 6 L/día durante 3 a 6 meses, para disminuir hasta 0.4 L antes de que la planta muera (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008). Una vez que la planta muere es removida y sustituida por brotes jóvenes, tal y como se describió previamente (Monterrubio 2007; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

En la herida que deja la castración, en el centro del pedúnculo del maguey o *mezontete*, se raspa una cavidad o cajete. En ella se acumula gradualmente el aguamiel, el cual es succionado por el tlachiquero, dos o tres veces al día, según vaya aumentando su producción, con una calabaza larga y seca denominada "*acocote*" (*Lagenaria siceraria*) o con un "*alacate*", elaborado con la unión de

dos botellas de plástico a las que se les corta el fondo. Cada vez que se hace la extracción, la superficie de la cavidad debe rasparse para mantener los vasos abiertos y permitir que la savia fluya. El aguamiel extraído se vacía en recipientes hechos de cuero o madera, denominados "*odres*" o "*castañas*" respectivamente, o de plástico, y en ellos se transporta a los tinacales o cuartos especiales donde se realiza la fermentación en tanques abiertos de cuero, madera, fibra de vidrio, plástico o mampostería, usualmente con capacidad de 700 L.

La fermentación del aguamiel se induce agregando una pequeña porción de aguamiel fermentado o *"semilla"*, *"pie"*, *"xináxtli"* o *"nancle"*. Ésta se prepara con 10 a 15 L de aguamiel de la mejor calidad (el más limpio y de mayor densidad) considerado tipo I en la NMX-V-022 (SECOFI, 1972a), que se vierte en una tina de cuero dedicada ex profeso a este fin, y se deja fermentar espontáneamente en un pequeño cuarto adjunto al tinacal. La tina se cubre y se deja fermentar hasta que la espuma cesa y termina la fermentación alcohólica y empieza la acética lo que se observa con la formación de una capa densa en la superficie denominada "*zurrón*". La elaboración de la semilla tarda de 1 a 4 semanas según la estación y la temperatura del año. Esta semilla puede utilizarse directamente en la producción de pulque a pequeña escala, o bien para elaborar el inóculo pie de cuba o el pulque pie de cuba necesario para mantener la producción comercial de la bebida. Este inóculo se prepara mezclando la semilla, en una proporción de 1:3 v/v, con 600 o 900 L de aguamiel tipo I, que se deja fermentar hasta que el agotamiento de los azúcares limite el crecimiento microbiano. Para iniciar la producción comercial de pulque se traspasa un determinado volumen del pie de cuba a cada una de las segundas tinas de fermentación y se mezcla con aguamiel tipo II en una proporción 1:1 (v/v) (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2004; SECOFI, 1972a). La cantidad de pie de cuba y de aguamiel que se adicionan diariamente a las tinas de fermentación varían dependiendo de la carga microbiana del pie de cuba, de la calidad del aguamiel, de las condiciones climatológicas y de la demanda del producto. La fermentación se realiza durante varios días dependiendo de la temperatura, los cambios estacionarios y otros factores no controlados. El proceso termina cuando la bebida alcanza el grado alcohólico, la densidad, índice de refracción, sólidos totales, azúcares, gomas y acidez total establecidos en la NMX-V-037 (SECOFI, 1972b), y presenta las características sensoriales propias. El producto tiene una vida media de 1 a 3 días por lo que debe comercializarse rápidamente para que no pierda sus propiedades más deseables (Álvarez, 1987; Loyola-Montemayor, 1956).

La norma del pulque distingue dos tipos de pulque, el tipo I que incluye el pulque de semilla y el pulque pie de cuba o punta, los cuales son fuertes y ocasionalmente ácidos, y el tipo II que se refiere al pulque comercial también llamado "*tlachique*", que se caracteriza por ser poco fermentado y dulce (SECOFI, 1972b).

Algunos productores manifiestan que el pulque puro puede conservar sus atributos sensoriales por más tiempo en comparación con el pulque adulterado con agua, azúcares y gomas.

» *Composición y propiedades fisicoquímicas del aguamiel*

El aguamiel es un líquido traslúcido, de color ambarino, de olor y sabor característicos que se aprecian mediante prueba de catado (NMX-V-022-1972, SECOFI, 1972a). Está compuesto principalmente por agua, azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, fructooligosacáridos [FOS] y agavinas), aminoácidos libres, proteínas, y sales minerales (Tabla 3.1) (Escalante *et al.*, 2008; Ortiz-Basurto *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2004); recientemente en un estudio sobre la caracterización de aguamiel de Tecamachalco (Puebla), Castro y Guerrero (2014) reportaron un contenido significativo de capacidad antioxidante de 5.01 ± 0.06 trolox.

TABLA 3.1 Análisis químico de diversas muestras de aguamiel provenientes de diferentes estados

COMPUESTO	HIDALGO[a]	MÉXICO[a]	PUEBLA[b]*	TLAXCALA[c]
°Brix				11.41
pH				6.3
Proteína•			0.34	0.34
Cenizas•	0.4	0.3	0.37	0.53
Carbohidratos•				
Sacarosa			1.0	
Fructosa			3.7	4.7
Glucosa			3.0	2.3
Fructooligosacáridos			1.17	
Minerales▾				
Calcio	10.0	20.0	8.1	
Fósforo	20.0	9.0		
Hierro	0.4		0.1	
Vitaminas▾				
Tiamina	0.1	0.02		
Riboflavina	0.01	0.03		
Niacina	0.5	0.4		
Ácido ascórbico♠	11.3	6.7	nd	
Aminoácidos▾				
Lisina			3.1	
Triptófano			0.46	
Histidina			0.69	
Fenilalanina			2.64	

Fuentes: [a]Cravioto *et al.*, (1951), [b]Ortiz Basurto *et al.*, (2008), [c]Flores *et al.*, (2008), [d]Ramírez *et al.*, (2004).
*Promedio muestras analizadas, •g/100mL; ▾mg/100mL; ♠µg/100mL; nd no detectado.

TABLA 3.1 Continuación

COMPUESTO	HIDALGO[a]	MÉXICO[a]	PUEBLA[b]*	TLAXCALA[c]
Leucina			1.26	
Treonina			1.84	
Metionina			0	
Valina			1.26	
Arginina			3.45	
Tirosina			1.15	

Fuentes: [a]Cravioto *et al.*, (1951), [b]Ortiz Basurto *et al.*, (2008), [c]Flores *et al.*, (2008), [d]Ramírez *et al.*, (2004).
*Promedio muestras analizadas, •g/100mL; ▾mg/100mL; ♠μg/100mL; nd no detectado.

De acuerdo a la NMX-V-022 (SECOFI, 1972a), se definen dos tipos de aguamiel para la producción de pulque. El tipo I define al aguamiel de buena calidad (limpio y con un alto contenido de azúcares, pH <6.6–7.5 y <0.9–1.03 mg de ácido láctico en 100 mL), mientras que el aguamiel de tipo II incluye al aguamiel ligeramente ácido (pH <4.5 y <4 mg de ácido láctico en 100 mL). Las características de los dos tipos de aguamiel se presentan en la Tabla 3.2.

El aguamiel constituye un sustituto de agua o una alternativa de suplemento alimenticio en localidades donde el agua es escasa o de mala calidad, o bien donde no existe la

TABLA 3.2 Características del aguamiel tipo I y tipo II de acuerdo a la NMX-V-022-1972

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO II
	Mínimo	Máximo	Menor que
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Bé)	5.0	7.0	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20 °C	59.0	100.0	27.0
Sólidos totales g/100 mL	13.0	17.0	7.0
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 mL	8.0	12.0	6.0
Azúcares reductores directos (en glucosa) g / 100 mL	2.0	3.0	3.0
Gomas (en glucosa) g/100 mL	2.0	6.0	0.2
Proteínas mg/100 mL	300.0	600.0	100.0
Cenizas mg/100 mL	300.0	430.0	180.0
	No mayor que		
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico)	0.9	1.03	4.0

suficiente disponibilidad de proteína (García-Garibay y López-Munguía 1993; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Ortiz-Basurto *et al.*, 2008; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Steinkraus, 1996).

La cantidad y composición del aguamiel durante el periodo de producción de la planta varía dependiendo del tipo de agave, la estación del año, la humedad relativa y las propiedades del suelo (Sánchez-Marroquín, 1970).

3.3.5 FERMENTACIÓN DEL PULQUE

El aguamiel por su composición química es un medio favorable para el desarrollo de numerosos microorganismos. Desde que el aguamiel se acumula en el cajete, los microorganismos presentes en la pared, en los instrumentos utilizados en la raspa y en la extracción del aguamiel, así como los provenientes del ambiente, o los introducidos por vectores (insectos u otros animales) que visitan el cajete, inician la fermentación espontánea que se activa vigorosamente cuando el aguamiel es mezclado con la semilla en los tanques de fermentación.

Los microorganismos presentes en el aguamiel y el pulque se clasifican en dos grandes grupos, bacterias y levaduras, aunque eventualmente también puede haber hongos. En el aguamiel y en el pulque fresco hay una predominancia de bacterias (x 10^8 UFC/mL) sobre las levaduras (x 10^6 UFC/mL), debido probablemente al pH (6.5-7.4) del sustrato. La población de levaduras se incrementa gradualmente durante la fermentación, alcanzando valores semejantes o incluso superiores a los de las bacterias (x 10^8 UFC/mL). Esto se debe principalmente a la actividad de las bacterias lácticas que modifican la acidez y el pH del aguamiel favoreciendo el desarrollo de las levaduras. Conforme se lleva a cabo la transformación del aguamiel, se propicia una serie de cambios químicos que favorecen el desarrollo de distintos grupos microbianos como sigue:

1. Bacterias lácticas (*Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. *homo* y *heterofermentativos*).
2. Levaduras (*Saccharomyces* spp. y no-*Saccharomyces*) y *Zymomonas mobilis.*
3. Bacterias productoras de dextranas, levanas, agavinas e inulinas (*Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Z. mobilis*).
4. Bacterias acéticas (*Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp.).
5. Microorganismos putrefactivos.

Sin embargo, de acuerdo con los estudios de Sánchez-Marroquín *et al.*, realizados entre 1953 y 1970 los microorganismos esenciales en la fermentación del pulque son: *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, mismos que se utilizaron para desarrollar un cultivo iniciador en la producción industrial de la bebida.

3.3.6 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Desde la década de los cincuenta del siglo XX el maguey pulquero sufrió una sobreexplotación y un escaso cultivo por lo que ha sido declarado en peligro de extinción. De 1940 a 2012 el cultivo de maguey pulquero disminuyó en Hidalgo, Tlaxcala y el Estado de México en un 93%, 94% y 81%, respectivamente, y la deforestación

magueyera ha tenido un alto impacto ecológico en la región. En 1990 se contaba con 100 millones de plantas, pero para inicios del 2006 sólo se conservaban 20 millones (Aguilar-Juárez *et al.*, 2014; SIAP, 2013; INEGI, 2012), perdiéndose en 16 años 80% de la plantación (Figura 3.1). Esta situación se ha presentado en todos los estados que alguna vez fueron importantes productores de maguey pulquero y de pulque (Narváez-Suárez y Jiménez-Velázquez, 2014).

El decremento en el cultivo del maguey pulquero tiene varias causas, como son cambio en el uso del suelo el que se ha convertido en área urbana; cambio de los cultivos de maguey por el de otras plantas, como la cebada; modificación de los hábitos de consumo de pulque y aguamiel; el bajo precio que se paga a los productores por la materia prima y por la bebida, así como el aumento en los insumos de producción, por mencionar algunos.

Respecto a la producción de pulque, el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó que en 2013 los estados con mayor producción fueron Hidalgo con 33.8 millones de litros, lo que representó 84.9 % de la producción nacional, seguido por Tlaxcala con 12 millones de litros (30.26%) y Puebla con 1.9 millones de litros (4.79%); estando el resto de la producción distribuido en el Estado de México (0.87%), Veracruz (0.18%), San Luis Potosí (0.075%), Guanajuato (0.014%) y Guerrero (0.005%).

Además, en el periodo de 1950 a 2015 la cantidad de pulquerías disminuyó entre el 88% y 97% en la Ciudad de México y en los estados de Hidalgo, México y Tlaxcala,

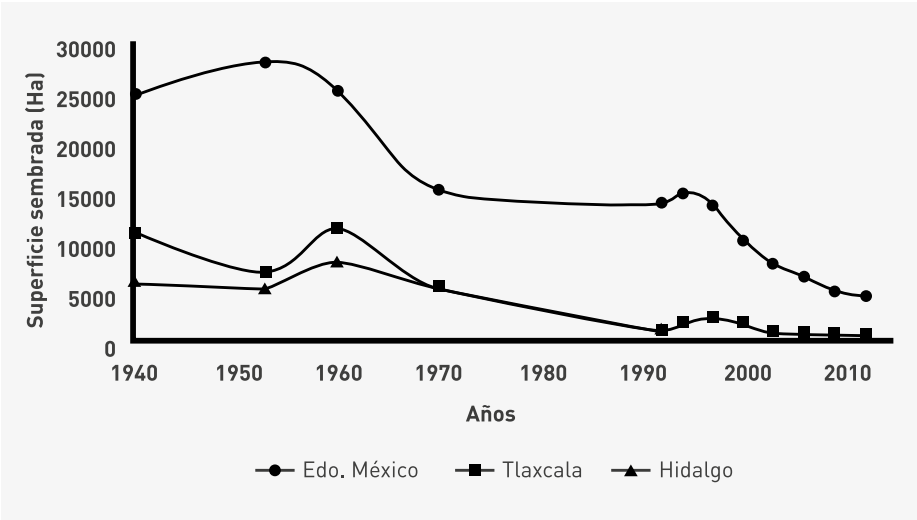


Figura 3.1 Superficie sembrada con magueyes pulqueros en los principales estados productores. Fuente: Aguilar-Juárez *et al.,* 2014; siap, 2013; inegi, 2012.

principales zonas consumidoras de la bebida, lo que ha dificultado su desplazamiento y comercialización (Figura 3.2).

Para recuperar la industria del pulque es necesario efectuar una serie de cambios y mejoras desde la producción de magueyes hasta los procesos de elaboración de la bebida. Para lograr estos objetivos se requiere implementar programas y políticas adecuadas que permitan rescatar la planta para recobrar el prestigio e importancia que tuvo por miles de años en nuestro país, ya que posee infinidad de usos y propiedades que pueden complementar el ingreso de cientos de familias rurales y urbanas del Altiplano central mexicano e incluso de otros lugares del país (Narváez-Suárez y Jiménez-Velázquez, 2014).

3.3.7 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

» *Estudios microbianos del pulque*

A lo largo de la historia el pulque ha sido objeto de numerosas investigaciones étnicas, sociales, históricas y médicas. Sin embargo, los estudios científicos de la bebida se iniciaron con los trabajos de Río de la Loza (1864). A partir de esa fecha numerosos investigadores tanto nacionales como extranjeros, se han enfocado en el estudio del aguamiel y del pulque con el fin de estudiar su fermentación, identificar los microorganismos principales que participan en el proceso, conocer sus características químicas y nutricionales distintivas, así como mejorar los métodos de elaboración, conservación y envasado del pulque.

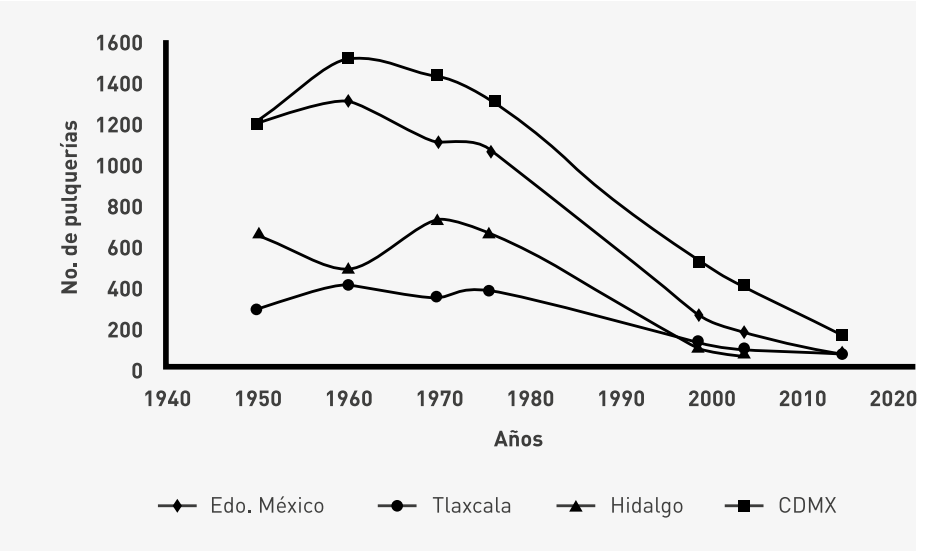


Figura 3.2 Decremento en el número de pulquerías de 1950 a 2015 en los principales estados consumidores de pulque. Fuente: Aguilar-Juárez *et al.*, 2014; Wired s/f.

En años recientes el estudio microbiano del pulque se realiza en forma integral abarcando todas las etapas de elaboración y de fermentación (desde la materia prima hasta el producto final) y se emplea una metodología polifásica que combina técnicas dependientes con independientes del cultivo basada en la extracción del ADN total y su análisis mediante diferentes métodos moleculares. Los microorganismos que han sido aislados hasta la fecha de esta bebida se enlistan en la Tabla 3.3.

TABLA 3.3 Microorganismos reportados en diferentes estudios del pulque.

NIVEL TAXONÓMICO	ESPECIES
BACTERIAS	
REINO MONERA	
Bacterias lácticas	
***Phylum* Firmicutes**	
Clase Bacilli	
Orden Lactobacillales	
Familia Aerococcaceae	*Aerococcus urinaeequi*
Familia Lactobacillaceae	*Lactobacillus* sp., *L. acetotolerans, L. acidophilus, L. brevis, L. buchneri, L. collinoides, L. composti, L. delbrueckii, L. delbrueckii* subsp. *lactis, L. hilgardii, L.kefir, L. leichmannii, L. paracasei, L. paracollinoides, L. plantarum, L. sanfranciscensis*
Familia Leuconostocaceae	*Leuconostoc* spp., *L. citreum, L. gelidum* subsp. *gasicomitatum, L. kimchii, L. mesenteroides* subsp. *dextranicum, L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides, L. pseudomesenteroides, Fructobacillus durionis*
Familia Streptoccocaceae	*Lactococcus* sp., *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Streptococcus* sp., *Streptococcus devriesei*
Esporulados	
Orden Bacillales	
Familia Bacillaceae	*Bacillus* spp., *Bacillus licheniformis, B. simplex, B. subtilis*
Familia Staphylococcaceae	*Macrococcus caseolyticus*
Clase Clostridia	
Orden Clostridiales	
Familia Clostridiaceae	*Sarcina* sp.
***Phylum* Actinobacteria**	
Clase Actinobacteria	
Orden Micrococcales	
Familia Micrococcaceae	*Micrococcus luteus, Kocuria rosea*
Familia Microbacteriaceae	*Microbacterium arborescens*
Familia Cellumonadaceae	*Cellulomonas* spp.

Fuentes: Escalante *et al.,* 2012; Escalante *et al.,* 2016; Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2013; Wacher-Rodarte *et al.,* 2014.

TABLA 3.3 Continuación.

NIVEL TAXONÓMICO	ESPECIES
***Phylum* Proteobacteria**	
Clase α Proteobacteria	
Orden Sphingomonadales	
Familia Sphingomonadaceae	*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis, Z. mobilis* subsp. *pomaceae*
Bacterias acéticas	
Orden Rhodospirillales	
Familia Acetobacteraceae	*Acetobater* spp., *A. aceti, A. malorum, A. pomorum, Gluconobacter asai, G. orientalis, G. oxydans, Komagataeibacter xylinus*
Clase β Proteobacteria	
Orden Burkholderiales	
Familia Comamonadaceae	
Genera *Incertae sedis*	*Sphaerotilus* sp.
Clase γ Proteobacteria	
Orden Pseudomonadales	
Familia Moraxellaceae	*Acinetobacter radioresistens*
Familia Pseudomonadaceae	*Chryseomonas luteola, Pseudomonas* spp.
Familia Enterobacteriaceae	*Citrobacter* sp., *Enterobacter* spp., *E. cloacae, Erwinia rhapontici, Escherichia* sp., *Hafnia alvei, Klebsiella neumoniae, Kluyvera ascorbata, K. intermedia, Pantoea agglomerans, Providencia* sp., *Serratia grimensii*
Orden Xanthomonadales	
Familia Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas* sp.
***Phylum* Bacteroidetes**	
Clase Flavobacteria	
Orden Flavobacteriales	
Familia Flavobacteriaceae	*Chryseobacterium* sp., *Flavobacterium johnsoniae, F. oryzihabitans*
LEVADURAS	
REINO FUNGI	
***Phylum* Ascomycota**	
***Subphylum* Saccharomycotina**	
Clase Saccharomycetes	
Subclase Saccharomycetidae	
Orden Saccharomycetales	
Familia Debaryomycetaceae	*Meyerozyma quilliermondii, Priceomyces carsonii*
Familia Dipodascaceae	*Galactomyces candidus*
Familia Metschnikowiaceae	*Clavispora lusitaniae*

Fuentes: Escalante *et al.,* 2012; Escalante *et al.,* 2016; Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2013; Wacher-Rodarte *et al.,* 2014.

TABLA 3.3 Continuación.

NIVEL TAXONÓMICO	ESPECIES
Familia Pichiaceae	*Pichia* spp., *P. membranifaciens*
Familia Saccharomycetaceae	*Kluyveromyces lactis, K. marxianus, Saccharomyces* spp., *S. bayanus, S. cerevisiae, Torulaspora delbrueckii*
Familia Saccharomycodaceae	*Hanseniaspora uvarum*
Familia Incertae sedis	*Candida parapsilosis, C. rugosa, C. rugopelliculosa*
***Phylum* Basidiomycota**	
***Subphylum* Puccioniomycotina**	
Clase Microbotryomycetes	
Orden Sporidiobolales	
Familia *Incertae sedis*	*Rhodotorula* spp., *R. mucilaginosa*
MOHOS	
REINO FUNGI	
***Phylum* Zygomycota**	
***Subphylum* Mucormycotina**	
Clase *Incerta Sedis*	
Orden Mucorales	
Familia Rhizopodaceae	*Rhizopus stolonifer*
***Phylum* Ascomycota**	
***Subphylum* Pezizmycotina**	
Clase Euroriomycetales	
Subclase Eurotiomycetidae	
Orden Eutoriales	
Familia Trichocomaceae	*Aspergillus* spp., *A. glaucus, A. niger., Penicillium glaucum*

Fuentes: Escalante *et al.,* 2012; Escalante *et al.,* 2016; Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2013; Wacher-Rodarte *et al.,* 2014.

» *Estudios químicos, nutrimentales y funcionales del pulque*

Existen numerosos trabajos sobre la composición química del aguamiel, del pulque artesanal y del industrializado en planta piloto y a pequeña escala. Río de la Loza (1864) fue el primero en establecer que los principales componentes del pulque tradicional eran sacarosa, gomas y cenizas. La Tabla 3.4 expone los resultados de los análisis realizados por diversos investigadores en muestras de pulque de distintas localidades y épocas. Sánchez-Marroquín (1977) estudió la composición del pulque elaborado en una planta piloto, y estableció que los principales cambios que se presentaban en el aguamiel pasteurizado fermentado con una mezcla de cultivos puros de: *Lactobacillus* sp. homofermentativo, *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *S. cerevisiae* y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* eran: la disminución de pH, de sólidos totales (°Brix), azúcares

TABLA 3.4 Composición química de diferentes muestras de pulque comercial e industrializado.

COMPUESTO	PULQUE[a]*	TLACHI-QUE[a]	PUL-QUE[b]*	ENVA-SADO[c]	TRADICIO-NAL[d]*	PLANTA PILOTO[d]*	NÉCTAR DEL RAZO[e]*
°Brix						6.00	
pH						4.60	
Proteína•	0.41	0.20	0.37		0.29	0.17	0.37
Cenizas•	0.20	0.20	0.24			0.29	0.24
Carbohidratos•							
Sacarosa						0.42	
Glucosa						0.06	
Minerales▾							
Calcio	10.50	10.00	11.00	11.50			11.00
Fósforo	8.00	5.00	6.00	34.50			6.00
Hierro	0.70		0.70	0.65			0.70
Vitaminas▾							
Tiamina	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Riboflavina	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
Niacina	0.33	0.15	0.35	0.42	0.28	0.37	0.35
Piridoxina					0.02	0.03	
Biotina♣					21.00	23.00	
Ácido ascórbico	5.70	4.60	5.10	2.70			5.10
Aminoácidos							
Lisina				16.20	3.00	7.50	12.00
Triptófano				2.70	2.50	9.00	
Histidina				4.70			
Fenilalanina				11.20	4.00	10.00	
Leucina				10.50	6.50	7.50	
Treonina				6.40	4.00	6.00	
Metionina				0.70	1.50	5.00	
Valina				6.60	3.00	5.00	
Arginina				10.90	2.50	7.50	
Tirosina					25.00	32.00	

Fuentes: [a]Cravioto *et al.*, (1951), [b]Instituto de Nutriología, citado en Loyola-Montemayor (1956), [c]Massieu *et al.*, (1959), [d]Sánchez-Marroquín (1977), [e]Ramirez *et al.*, (2004). *Promedio muestras analizadas: •g/100 mL; ▾mg/100 mL;♣µg/100 mL.

reductores directos, sacarosa y goma, y un incremento en la acidez total y volátil, y en el contenido de etanol (Steinkraus, 1996).

En años recientes este enfoque se ha diversificado para conocer el valor nutritivo y funcional del aguamiel y del pulque ya que poseen sustancias muy variadas que los diferencian de otros productos vegetales y que diversifican su posible aplicación.

Tradicionalmente el pulque ha sido considerado una bebida saludable y con propiedades nutricionales

Tradicionalmente el pulque ha sido considerado una bebida saludable y con propiedades nutricionales debido a su contenido de aminoácidos, en particular de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano escasos en la dieta con base en maíz, de vitaminas del complejo B y vitamina C (sintetizadas principalmente por levaduras durante el proceso de fermentación), y hierro biodisponible, además de proporcionar energía inmediata por la ingesta de etanol y ácido láctico (Backstrand *et al.*, 2002; Cravioto *et al.*, 1951; Loyola-Montemayor, 1956; Massieu *et al.*,1949, 1959; Ramírez *et al.*, 2004; Sánchez-Marroquín, 1967; Steinkraus, 1996).

Para algunos sectores sociales de México, como los otomíes del Valle del Mezquital o los pobladores de las zonas altas del Estado de México, que consumen pulque como parte de su dieta diaria, la bebida coadyuva a suplir la carencia de proteína (mediante el aporte de proteína microbiana de buena calidad), de aminoácidos esenciales (lisina y triptófano) y vitaminas (niacina tiamina, riboflavina, ácido ascórbico) (Backstrand *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 1998), además de disminuir las deficiencias de ferritina y hemoglobina debido a una mejor absorción y biodisponibilidad del hierro en presencia del ácido ascórbico y del etanol (Backstrand *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 1995). En la población materno infantil de comunidades rurales de ese estado también se ha demostrado que el consumo moderado de pulque, durante los periodos de gestación y lactancia, ayuda al desarrollo psicomotor del niño, debido primordialmente a su contenido energético, de vitaminas y de triptófano, que es precursor de algunas neuro-hormonas (Chávez *et al.*, 1998).

Por su contenido de polímeros tipo inulina, FOS y gluco-oligosacáridos, Ortiz-Basurto *et al.*, (2008) consideran que el pulque tiene actividad prebiótica, ya que dichos sustratos, pueden afectar la diversidad y actividad de la biota intestinal confiriendo beneficios a la salud del consumidor (MacFarlane *et al.*, 2008). Los polímeros de agave resisten la actividad hidrolítica de las enzimas digestivas del hombre, no se digieren en el intestino delgado y no incrementan la glucosa sérica cuando se ingieren, por lo que cumplen con los requisitos de un prebiótico.

Además, diversos autores han señalado que tanto el aguamiel como el pulque pueden ser considerados alimentos funcionales

debido a la presencia de las bacterias ácido lácticas *L. acidophilus* y *L. mesenteroides*, de *Z. mobilis* y de levaduras (Alves de Azeredo *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2001; Escalante *et al.*, 2004, 2008, 2012; Gonçalves de Lima, 1978; Steinkraus, 1996; Wanick, 1970).

Recientemente Escalante *et al.*, (2016) reportaron que en diferentes especies de *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides; L. mesenteroides*), y *Lactobacillus* (*L. brevis, L. collinoides, L. composti, L. paracasei* subsp. *paracasei, L. plantarum, L. sanfranciscensis*) aisladas de pulque se ha corroborado su:

1. Resistencia a las barreras antimicrobianas del tracto gastrointestinal como son: lisozima presente en la saliva, pH ácido, solución gástrica y sales biliares (Castro-Rodríguez *et al.*, 2015; Giles-Gómez *et al.*, 2016; González-Vázquez *et al.*, 2015; Reyes-Naya *et al.*, 2016; Torres-Maravilla *et al.*, 2016).
2. Actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *S. enterica serovar Typhi* y *Listeria monocytogenes* (Castro-Rodríguez *et al.*, 2015; Giles-Gómez *et al.*, 2016; González-Vázquez *et al.*, 2015; Torres-Maravilla *et al.*, 2016).
3. Adherencia *in vivo* a la mucosa intestinal de ratones (Castro-Rodríguez *et al.*, 2015).
4. Actividad anti-inflamatoria *in vivo* en un modelo de ratón (Torres-Maravilla *et al.*, 2016).
5. Efecto anti-colesterolémico *in vivo* (Reyes-Naya *et al.*, 2016).
6. Efecto anti-infectivo contra *S. enterica serovar Typhymurium* (Giles-Gómez *et al.*, 2016).

Existen evidencias arqueológicas que sugieren el uso del pulque como enema para remediar trastornos gastrointestinales. Actualmente se sabe que esta práctica provee directamente con probióticos al colon, sin tener que atravesar la barrera de ácido del estómago, facilitando su supervivencia e implante en la mucosa intestinal, ayudando a combatir padecimientos del aparato digestivo, además de mejorar la respuesta inmune sistémica (Lemus, 2006; Wacher-Rodarte *et al.*, 2014).

3.3.8 TOXICOLOGÍA DEL PULQUE

Varios investigadores han tratado de correlacionar la ingesta de pulque con la alta incidencia de cirrosis y mortalidad en comunidades indígenas rurales; sin embargo se ha establecido que estos trastornos son similares a los relacionados con un consumo excesivo de cualquier bebida alcohólica no destilada, determinándose que pueden ser otros factores asociados a la ingesta de la bebida, como la presencia de endotoxinas generadas por enterobacterias en productos con mala calidad sanitaria o la deficiencia nutricional de los consumidores, los que determinen el desarrollo de dicho padecimiento (Kershenovich, 1999; Medina Mora, 1999; Narro-Robles *et al.*, 1992; Stoopen, 1999; Vargas, 1999).

Recientemente Gómez-Aldapa *et al.*, (2011, 2012) inocularon distintas especies de bacterias patógenas en muestras de aguamiel y semilla de diversa procedencia, con el fin de determinar si eran sustratos adecuados para el desarrollo y sobrevivencia de dichos microorganismos. Inicialmente observaron en el aguamiel un incremento

en la población de los patógenos seguido de un decremento, mientras que en la semilla y durante la fermentación del pulque los microorganismos murieron excepto *E. coli* O157:H7 que fue tolerante a las concentraciones de etanol, ácidos y antimicrobianos del pulque, por lo que los autores concluyeron que deben realizarse más investigaciones con el fin de esclarecer cuál es el riesgo que representa el consumo de aguamiel y pulque no higiénico.

Desde la época prehispánica el pulque ha sido utilizado para tratar diversas enfermedades

3.3.9 PROPIEDADES MEDICINALES DEL PULQUE

Desde la época prehispánica el pulque ha sido utilizado para tratar diversas enfermedades. Durante el periodo colonial varios cronistas, historiadores y científicos como De Sahagún (2003), De Benavente (Motolinia) (1963), De la Cruz y Badiano (1964), Clavijero (1978), Bartolache (1979), De Balmis (1794) así como el Tribunal del Protomedicato describieron y analizaron los efectos terapéuticos del maguey y sus productos en distintas enfermedades.

El pulque se utilizó para controlar trastornos gastrointestinales (como dispepsia, gastralgia, gastritis y diarrea), respiratorios (tos, bronquitis, neumonía), renales (pielonefritis), alimenticios (anorexia, suplemento proteico, de aminoácidos y vitaminas), algunos tipos de neuralgias, astenia, vértigo y tratar algunas enfermedades (tifo, pitiriasis y sífilis, entre otras) así como facilitar la cicatrización usando los asientos del pulque en cataplasmas; además en la etapa de lactancia se les proporcionaba a las madres como galactogogo para incrementar la producción de leche, y fue suministrado a infantes sin perjudicarlos. Desgraciadamente muchos de estos usos no han sido comprobados científicamente por lo que, desde la época prehispánica el uso curativo tanto del aguamiel como del pulque ha quedado restringido a la farmacopea tradicional.

A partir de aguamiel fermentado con especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, Sánchez-Posada obtuvo un producto ácido, denominado "*Naturacid AB*", que fue utilizado para curar diversas afecciones del aparato digestivo como úlceras, gastritis y esofagitis (Ulloa *et al.*, 1987).

Varios autores han señalado que *Z. mobilis* (bacteria frecuentemente aislada del pulque) ejerce una acción antagónica hacia otras bacterias (como *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis* y *E. coli*) y hongos (Wanick, 1970). Esto explica la utilización de esta bebida para contrarrestar infecciones intestinales, debido a que posee un efecto deletéreo sobre la membrana celular de las bacterias patógenas, que inhibe su respiración (Lemus *et al.*, 1991; Maldonado *et al.*, 2001). Esto junto con la posible actividad prebiótica y probiótica

del pulque explicaría su utilización en el control de desórdenes gastrointestinales. Además, varias especies de *Agave* contienen saponinas o esteroles vegetales que presentan actividad antibiótica y antiinflamatoria (Peana *et al.*, 1997; Ramírez-Rancaño, 2000). El pulque contiene cantidades significativas de estos compuestos, pero se desconoce si son bioactivos y cuál sea su efecto funcional (Schultes, 1979).

3.3.10 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

» *Problemática de las plantas de maguey*

La propagación asexual desmedida provocada por la siembra exclusiva de hijuelos, la disminución de los polinizadores de plantas no destinadas a la producción de pulque y la interrupción de la reproducción sexual que se requiere para producir el aguamiel, es factible que haya convertido a la especie de *A. salmiana*, a través del tiempo, en ineficientemente reproductiva.

Investigaciones realizadas para producir plantas en invernadero a partir de semillas, han generado posibilidades para recuperar la variabilidad genética de las especies utilizadas y seleccionadas para producir pulque, así como emplear a la par la producción de hijuelos (reproducción vegetativa) o de plantas generadas por cultivo de tejidos que permitan asegurar su disponibilidad para un aprovechamiento integral del agave; al momento algunas empresas e instituciones ya están produciendo plantas a gran escala a partir de estas técnicas para crear nuevas plantaciones (Vázquez Díaz *et al.*, 2011).

Para ello se requiere que el gobierno desarrolle programas para la reactivación de la industria pulquera, que incluyan programas de replantación de magueyes pulqueros, leyes que protejan a la planta de los depredadores, tanto de "*mixioteros*" como de los que se roban las pencas o las planta completas, y su cumplimiento; capacitación a pequeños y medianos productores mediante nuevos modelos de extensionismo, para la transmisión de conocimientos y el incremento de la productividad de las pequeñas unidades de producción campesina; desarrollo de nuevos productos derivados del maguey con el fin de darle un aprovechamiento integral y un valor agregado, lo que será de más interés para los campesinos; comercialización justa de todos los productos y subproductos del agave, y apoyos económicos a los productores, ya que el maguey es una planta que requiere de varios años para poder ser explotada.

Este tipo de programa incidiría directamente no sólo en el bienestar del campesino y su familia, sino también en el beneficio ecológico y en el aumento en la producción y protección de las tierras de cultivo (Aguilar-Juárez *et al.*, 2014).

» *Calidad del aguamiel y desarrollo de estrategias alternativas de extracción*

La obtención de aguamiel higiénico a partir de plantas en las que se realice un raspado aséptico del cajete, es un aspecto de gran importancia a considerar, para

Pulque dispuesto a degustarse en fábrica "La Pulcatta". Zacatlán, Puebla.

lo cual deben de ser introducidos procesos de extracción y recolección y sistemas de almacenamiento y de manipulación adecuados. Si bien a la fecha no se han desarrollado alternativas eficientes para la extracción de aguamiel, se ha reportado el prensado del tallo de agave o la extracción del aguamiel con el uso de difusores. Aunque esta alternativa ha sido revisada previamente (Steinkraus, 1996), no se mencionan los resultados de su aplicación en el rendimiento y composición de los extractos resultantes. Esta posibilidad técnica de extracción de aguamiel podría requerir de la hidrólisis de los fructanos presentes en la planta tal y como se realiza en la fermentación del tequila y del mezcal, donde las piñas de maguey son cocidas (tratamiento térmico) o molidas y sujetas a una extracción acuosa para obtener azúcares fermentables, compuestos principalmente de fructosa derivadas de las agavinas y FOS. El periodo de 3 a 6 meses requerido para la extracción del aguamiel de preferencia debe ser reducido a unas pocas horas, pero debe tomarse en consideración que el medio extraído debe ser susceptible a la fermentación y no diferir en composición del aguamiel obtenido de forma tradicional.

El aguamiel por su composición química es un medio favorable para la proliferación de numerosas especies de microorganismos, por lo que es un líquido susceptible a una fermentación espontánea, la que se inicia desde que se acumula en el cajete.

Con la finalidad de evitar la fermentación del aguamiel recién colectado es necesario eliminar la microbiota nativa por lo que debe ser microfiltrado, pasteurizado o enfriado, dependiendo de la finalidad para la que se vaya a destinar.

3.3.11 FERMENTACIÓN

» *Establecimiento de un cultivo iniciador*

En el pulque se han definido dos procesos de fermentación:

1. Ácida realizada por especies de BAL y BAA que producen ácido láctico y/o acético
2. Alcohólica llevada a cabo por *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*, microorganismos que sintetizan etanol

Además se ha reportado la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) que incluyen dextranas y fructanos, por *L. mesenteroides* y *Z. mobilis* lo que algunos autores anteriormente consideraban como fermentación viscosa. Todos estos procesos en conjunto definen las características esenciales del pulque (acidez, contenido alcohólico y viscosidad).

Los trabajos realizados por Sánchez-Marroquín y su grupo sobre el pulque entre 1953 y 1970 (Steinkarus, 1996) tienen una gran relevancia no sólo en términos de la caracterización de la diversidad microbiana presente en el pulque, sino también por continuar los esfuerzos de modernización e industrialización del proceso de producción de la bebida. Sánchez Marroquín fue el primero en introducir una simplificación de la enorme diversidad microbiana aislada del pulque, para definir una mezcla de cultivos iniciadores compuesta por *Lactobacillus* sp., *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Sánchez-Marroquín, 1970; Sánchez-Marroquín *et al.*, 1957). Es importante destacar que *Z. mobilis*, bacteria por primera vez aislada y caracterizada a partir del pulque en 1924 (Lindner, 1928), ha sido asociada con la producción de etanol y como una especie de la microbiota nativa del pulque (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2004; Steinkarus, 1996), aunque Escalante *et al.*, (2004) la refieren como un microorganismo casual de la bebida. Se requiere de más estudios de ecología microbiana para poder definir la microbiota esencial que participa en la fermentación del aguamiel y que define las características distintivas del pulque.

» *Desarrollo de viscosidad*

Los EPS responsables de proporcionar la viscosidad característica del pulque han sido tradicionalmente asociados con la producción de dextranas por *L. mesenteroides* (Chellapandian *et al.*, 1998; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953), pero ésta puede estar determinada también por la producción de levanas, agavinas o por otros microorganismos (Escalante *et al.*, 2008, 2016; Morales Arrieta *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2007).

Aunado a la producción de etanol por *Z. mobilis*, se ha reportado también que es un microorganismo que produce levansacarasas, enzimas responsables de la producción de levanas. Las levanas son polímeros de fructosa de alto peso molecular

con enlaces β (2-6) entre unidades de fructosa. La producción de este polímero también induce una alta viscosidad. Es importante puntualizar que ningún autor ha medido con precisión el tipo y cantidad de glucanos y fructanos en el pulque. Sin embargo, como se ha mencionado, se comprobó que *Leuconostoc* spp. produce enzimáticamente dextranas, levanas y/o inulinas, tanto en sobrenadantes de cultivos libres de células o bien asociados a éstas (Chellapandian *et al.*, 1998; Torres-Rodríguez *et al.*, 2014).

La viscosidad característica del pulque es un aspecto de gran relevancia a considerar en el proceso de industrialización de la bebida. Sánchez-Marroquín *et al.*, (1957), reportaron la conveniencia de eliminar la "fermentación viscosa" en términos de mejorar la calidad y el proceso de operación industrial. Actualmente, para evitar la síntesis de EPS es posible invertir enzimáticamente toda la sacarosa del aguamiel. Como alternativa, la glucosa o fructosa pueden ser agregadas al medio para soportar una fermentación láctica y alcohólica; otra opción para que no se dé la producción de EPS, es evitar la presencia de *L. mesenteroides* en el cultivo iniciador, sin embargo, estas modificaciones podrían tener un efecto adverso sobre las propiedades probióticas del producto resultante.

» *Definición de la relación entre un inóculo y las características del producto final*

Sánchez-Marroquín *et al.*, (1957) no encontraron diferencias en la calidad del producto siguiendo diferentes estrategias de inoculación y parámetros tales como el tiempo de inoculación y la densidad de cada una de las cepas seleccionadas como iniciadores en relación con su velocidad de crecimiento (las bacterias lácticas crecen mucho más rápido que las levaduras), y la concentración final de sus principales productos metabólicos (ácido láctico, etanol y posiblemente de EPS).

3.3.12 SABOR DEL PULQUE

Sánchez-Marroquín (1970) reportó la medición de los perfiles de ésteres, pero no existen referencias que asocien la composición y perfil de estos compuestos con el buqué del pulque. La cantidad total de ésteres (como el etilacetato) está reportada como 20-30 mg/100 mL, aldehído (como acetaldehído) 2.5 mg/100 mL y alcoholes superiores (aceites de fusel) 80-100 mg/L. Se ha propuesto que la tradición de mezclar el pulque con frutas o vegetales (curados) es una práctica que tiene como finalidad corregir algunos defectos del producto final como puede ser el olor no deseado. Se presupone que la generación de diversos olores indeseables es el resultado de la contaminación por bacterias, que es frecuente en fermentaciones tradicionales. Posiblemente esta situación podría ser eliminada en un proceso de fermentación moderno, aunque si se conserven algunas etapas tradicionales del proceso. Se ha propuesto también que la generación de estos olores es el resultado de la combinación de la actividad metabólica de diversos microorganismos que estarían presentes de forma natural durante el proceso de fermentación. De León-Rodríguez *et al.*, (2008) reportaron los compuestos responsables del aroma en bebidas alcohólicas de agave detectados por cromatografía de

gases y por la técnica de HS-SPME-GC–MS (microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado a cromatografía de gases-espectrometría de masas) así como por análisis de componentes principales; identificaron 11 compuestos principales y 17 secundarios que pueden considerarse como marcadores de identidad de las bebidas y que son bebida-específicos. Se observó que el 3-metil-tio-1-propanol y el ácido nonanoico son específicos del pulque, y que pueden ser usados como marcadores de autenticidad. En este estudio el pulque es ubicado en un grupo distinto de otras bebidas de agave debido a su bajo contenido de etanol.

La viscosidad característica del pulque es un aspecto de gran relevancia a considerar en el proceso de industrialización de la bebida

3.3.13 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS DEL PULQUE

Los primeros esfuerzos para modernizar la industria del pulque datan de la primera década del siglo XX cuando la Compañía Expendedora de Pulques, S. A. realizó diversos intentos para mejorar el proceso de elaboración de la bebida y envasarlo. A partir de esa fecha se desarrollaron distintas tecnologías enfocadas a resolver varios aspectos en la industrialización de la bebida, algunas de las cuales llegaron a patentarse (Loyola-Montemayor, 1956). En 1960 se fundó el Patronato del Maguey que pretendió explotar de forma integral el potencial de la planta de agave.

Con base en las investigaciones realizadas por Sánchez-Marroquín y su grupo de trabajo, se desarrolló un proceso semi-industrial para fermentar aguamiel pasteurizado con un inóculo mixto de *Lactobacillus* sp. homofermentativo, *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *S. cerevisiae* y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; después de 96 horas de fermentación se obtuvo una bebida higiénica, estable, semejante al pulque tradicional (Sánchez-Marroquín, 1949, 1967, 1977, 1979; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953). El proceso se implementó en una planta piloto localizada en Santa María Tecajete, Zempoala, Hidalgo, que llegó a producir 50,000 L al día, los cuales fueron envasados en latas de 350 mL de capacidad y se comercializaron con la marca *Magueyin.* (Sánchez-Marroquín, 1977, 1979; Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Steinkraus 1996). Sin embargo, el producto no fue aceptado por el consumidor habitual de pulque, ya que carecía de algunas de las características distintivas del producto tradicional, además de tener un costo elevado.

Actualmente existen en el país varias compañías productoras de pulque procesado: Procesadora de Pulque S.A., Productos Naturales de Agave S.A. de C.V., Pulmex, en Tlaxcala; Desarrollo Agropecuario del Altiplano, Tecnología e Innovación en Pulque Industrial S.A. de C.V. y Torre Grande INC, en Puebla; y Pulquemex S.A.

de C.V. en Hidalgo (BANCOMEXT, 2007) que comercializan su producto en México y otras partes del mundo, explotando lo que los sociólogos denominan el "mercado de la nostalgia" (Ramírez *et al.*, 2004). La bebida se produce en pequeña escala industrial fermentando ya sea el aguamiel sin ningún tratamiento o pasteurizado, e induciendo la fermentación con un inóculo mixto de cultivos puros de levaduras y bacterias ácido lácticas no productoras exopolisacáridos, asegurando que sólo ellos realicen la fermentación y controlando así la calidad, inocuidad y características sensoriales del producto; o en algunos casos llevando a cabo una fermentación tradicional la cual es detenida por un proceso de pasteurización, de microfiltración o de un envasado aséptico (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Steinkraus, 1996). El proceso de producción se ha optimizado obteniendo un producto estable con algunas características diferentes a las del pulque tradicional, principalmente su baja viscosidad y discreto aroma, con el fin de adaptarlo a las preferencias de los nuevos consumidores tanto nacionales como extranjeros. Este pulque industrializado se comercializa natural o adicionado con fruta en diferentes tipos de envases y presentaciones.

3.3.14 CONSERVACIÓN DEL PULQUE Y ENVASADO

El mercado mexicano en los Estados Unidos y la creciente demanda por alimentos étnicos en la era de la globalización definen la necesidad del desarrollo de pulque producido a gran escala. Uno de los principales retos en este sentido, es la conservación del pulque. Debido a que es normalmente consumido fresco después de un cierto tiempo de fermentación, principalmente en áreas rurales, prácticamente no existen esfuerzos encaminados para desarrollar procedimientos de estabilización del producto. Deben de ser consideradas diversas posibilidades de procesamiento después de la fermentación, particularmente si continúa el incremento en su producción y comercialización. Estas decisiones involucran el uso de la pasteurización y filtración, así como la adición de agentes estabilizantes. Es importante considerar que, si la pasteurización del pulque se hubiera introducido al mismo tiempo que fue utilizada para la cerveza, sería muy probable que en la actualidad fuéramos testigos de una evolución distinta de ambas bebidas durante el siglo XX.

Resulta prácticamente imposible embotellar pulque fermentado sin pasteurizar debido a que los azúcares presentes no se agotan durante la fermentación y ésta se mantiene activa; actualmente, es deseable una cantidad residual de agavinas y FOS en la bebida con el fin de incrementar sus propiedades prebióticas. Por otro lado, la esterilización y la filtración a través de membranas son procesos que incrementan la vida de anaquel de la bebida al eliminar la microbiota, pero en el caso de la esterilización se afectan las propiedades funcionales y nutrimentales, y en el segundo se elimina la capacidad probiótica. En este sentido también se deben de considerar esfuerzos para preservar o suplementar su contenido de vitaminas y de hierro no-hemo.

Por otro lado, el uso de aditivos tales como conservadores, antioxidantes, colorantes o texturizantes, podrían afectar la imagen del pulque como una bebida natural y eventualmente, como producto orgánico. En el caso particular del pulque embotellado de la marca "*Pulque Cool Passion*" (Comercializadora de Pulques y Bebidas Poliuqui S.A. de C.V.), el producto contiene benzoato de sodio como conservador, así como colorante y azúcar. La selección de un empaquetado adecuado requiere la consideración de las características biológicas y de la posibilidad de oxidación fotoquímica, lo cual puede resultar un problema en su estabilidad durante su vida de anaquel. El paradigma aquí, reside en que al promover la industrialización del pulque, se deben de introducir cambios radicales en la percepción de la bebida, particularmente si se desean alcanzar nuevos mercados. Una ventaja es que los nuevos productores de pulque están probablemente ofreciendo un producto que la mayoría del público consumidor (particularmente en mercados extranjeros), no ha probado antes.

El pulque es una bebida tradicional prehispánica [...] que forma parte del acervo cultural de nuestro país

3.3.15 DEFINICIÓN DE UNA NUEVA NORMATIVIDAD SOBRE AGUAMIEL Y PULQUE

Actualmente es altamente probable que los procesos de producción del pulque requieran de modificaciones en el contexto de una nueva regulación de productos y de sus propiedades en el mercado mexicano, ya que el aguamiel era definido de forma específica en términos de su composición y calidad para elaborar el pulque exclusivamente, y el pulque en términos de calidad como bebida, en normas mexicanas aprobadas en 1972 (SECOFI, 1972a, 1972b).

3.3.16 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El pulque es una bebida tradicional prehispánica que ha persistido hasta el momento y que forma parte del acervo cultural de nuestro país. A pesar de que su consumo ha disminuido considerablemente como resultado de diferentes campañas de desprestigio provenientes de diversas épocas y su competencia con la cerveza durante el siglo XX, recientemente mediante diferentes estudios se ha demostrado que además de ser una bebida alcohólica, es también un producto con propiedades nutrimentales y funcionales, por lo que puede ser comercializada de forma artesanal e industrializada como un producto novedoso en distintos nichos de mercado.

Sin embargo, para lograr esta diversificación es necesario que la bebida sea elaborada bajo condiciones controladas que aseguren su calidad higiénica, inocuidad y vida de anaquel y que, mediante nuevas estrategias de mercado, pueda reposicionarse como

pulque o como otros nuevos productos, orgánicos o no, que tengan como base aguamiel o pulque, con grandes oportunidades para competir por un espacio en el mercado nacional e internacional.

Algunas de las perspectivas para lograr estos propósitos son la búsqueda de tratamientos no térmicos que permitan la estabilidad microbiana tanto del aguamiel como del pulque, sin que pierdan sus propiedades nutrimentales, funcionales y sensoriales.

Entre los tratamientos que se plantean está la tecnología de separación con membranas. Con la microfiltración sería posible obtener una bebida refrescante, microbiológicamente estable que conserve sus características sensoriales, nutritivas y funcionales. Adicionalmente, es posible realizar una ultrafiltración que permita retener los sólidos con los que se puedan elaborar otros productos como concentrados, dulces, geles, gomitas, helados, etc. Finalmente, con un permeado sería posible producir edulcorantes prebióticos que conserven las propiedades funcionales tanto del aguamiel como del pulque, y con sistemas de filtración adicionales obtener agua vegetal de origen natural.

En lo que al pulque se refiere éste también podría ser tratado por microfiltración con el fin de eliminar su microbiota y algunos de los componentes de mayor tamaño de la bebida, con la finalidad de obtener un producto alcohólico con olor y sabor característicos a pulque, libre de microorganismos, con apariencia cristalina y carente de viscosidad, lo cual sería atractivo para productores que buscan que la bebida mantenga sus características sensoriales tradicionales, que sea estable y que para su comercialización, presente una mayor vida de anaquel.

Es necesario continuar con los desarrollos tecnológicos desde el campo para incrementar la producción sustentable de los magueyes pulqueros, la extracción higiénica y en menor tiempo del aguamiel, así como el proceso controlado de fermentación y estabilización del pulque; con el fin de diversificar la comercialización de la bebida en distintas presentaciones, que mantengan en su mayoría las cualidades del producto original pero con una larga vida de anaquel, lo cual permita ampliar y consolidar el mercado en beneficio del pequeño y mediano productor.

Figura 3.3
Agave americana empleado para obtención de aguamiel para producir licor comiteco, en un rancho de la ciudad de Comitán de Domínguez, Chiapas. Fotografía:Orantes-García (2015).

3.4 COMITECO

3.4.1 DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN

El comiteco es una bebida fermentada que se elabora de manera tradicional en la Meseta Comiteca de Chiapas, se obtiene de *Agave americana* (Fig. 3.3) y *Agave salmiana* (Reynoso *et al.,* 2012a). Aunque algunos autores lo clasifican como un mezcal (Carrillo-Trueba, 2007; Durán-García *et al.,* 2007; Ramírez-Castañeda, 1994), la forma en que los pobladores de la ciudad de Comitán de Domínguez describen la elaboración del licor lo deja fuera de este tipo de bebidas, ya que no se obtiene de la fermentación y posterior destilación del mosto del maguey, aunque sí es una bebida destilada derivada de agave. Se produce de la fermentación del aguamiel que se colecta diariamente del corazón de la planta y se deposita en vasijas de madera, en donde es mezclado con agua y *"panela"* (piloncillo) y se deja reposar hasta que se agotan los nutrientes y la mezcla deja de hacer espuma, para posteriormente someterla a destilación. Reynoso *et al.,* (2012a) mencionan que el licor comiteco puede

contener hasta 22% de azúcar de caña y algunas veces se añaden frutas y hojas aromáticas, además de un trozo de una corteza llamada *"timbre"* (*Acacia angustissima*) (Velázquez, 2015), que se usa para precipitar sustancias mucilaginosas y como inductor de la fermentación.

3.4.2 ESTADO DEL ARTE

Actualmente no se han encontrado registros publicados que describan la composición química ni la microbiota asociada al licor comiteco. En 2015, la Dirección General de Normas y el Comité Consultivo Nacional de Normalización de la Secretaría de Economía expidió para consulta pública el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015 "Bebidas alcohólica denominación, especificaciones fisicoquímica, información comercial y métodos de prueba" en este documento, en el capítulo 7.2.10 el comiteco es descrito como sigue: "Es la bebida alcohólica mexicana obtenida por destilación de mostos formulados con Maguey Comiteco (jugos, aguamiel o jarabe) y enriquecidos con piloncillo o panela de caña en una proporción de al menos 70% de azúcares reductores provenientes del Maguey. Su graduación alcohólica es 40% a 50% Alc/Vol" (Marina, 2015).

La historia del comiteco inicia con la llegada de los frailes dominicos, quienes introdujeron el proceso de destilación a Comitán

3.4.3 HISTORIA DEL COMITECO

Según lo documenta Velázquez (2015), la historia del comiteco inicia con la llegada de los frailes dominicos, quienes introdujeron el proceso de destilación a Comitán usando como materia prima el aguamiel del agave que se obtenía en la región. Velázquez comenta que los nativos y sacerdotes tradicionales consumían la bebida sin destilar en ceremonias para comunicarse con sus dioses.

De manera industrial, el comiteco empezó a producirse en 1910 y para mediados de siglo se encontraba a la par de algunos tequilas de la época, al menos en la región sureste de México y en Centroamérica; sin embargo, debido a un aumento en los impuestos la producción se fue aminorando y posteriormente por decreto gubernamental la elaboración del licor fue prohibida a finales de 1960, volviendo a fabricarse de manera clandestina a escala artesanal o casera. Después de aproximadamente 10 años se inició el rescate de la producción industrial de la bebida, cuando un empresario cultivó 500 plantas de agave y aliándose con comunidades campesinas, inició la gestión de un permiso para producir el licor comiteco. El permiso se concedió en 1997.

FIGURA 3.4 Extracción de aguamiel de *A. americana* en un rancho de Comitán de Domínguez, Chiapas. Fotografía: Orantes-García (2015).

3.4.4 PROCESO DE ELABORACIÓN

Una vez que el maguey alcanza una edad de entre 4 y 6 años, como lo señalan también Godoy *et al.*, (2003) para el caso de la elaboración del pulque, se cava un orificio en el tallo de la planta para que se acumule el aguamiel, se extrae actualmente con un recipiente de plástico y se recolecta en una jarra después de colarlo (Figura 3.4), para posteriormente depositarlo en un recipiente de plástico de aproximadamente 20 litros de capacidad.

La colecta se hace de dos a tres veces por día, cada maguey produce aproximadamente 2 L de aguamiel por colecta y esta práctica puede extenderse hasta por 6 meses, según lo comentaron algunos productores. El maguey se raspa diariamente con un utensilio metálico con filo moderado (Figura 3.5) para propiciar que el aguamiel se siga produciendo.

Una vez extraído el aguamiel del agave, se deposita en recipientes de madera en donde es mezclado con panela y agua, se deja reposar para que *"levante"* burbujas, cuando la mezcla deja de hacer burbujas y se duerme, está lista para la destilación, proceso que antiguamente se hacía en un alambique de cobre sentado sobre un horno de barro y ladrillos, de la olla salía el *"cabezote"* (cilindro de cobre) que estaba conectado a otro cilindro llamado *"pasacañón"* que es por donde salía el vapor hacia una serpentina sumergida en una tina de agua, la cual condensaba el vapor para salir ya como licor que se añejaba en pipas de madera hasta su distribución y venta (Velázquez, 2015).

Actualmente, según el Señor Alberto Torres Cristiani (comunicación personal); empresario de la ciudad de Comitán de Domínguez, la fermentación puede hacerse en un recipiente de plástico de aproximadamente 200 litros de capacidad y la destilación se realiza en un alambique de acero inoxidable calentado con gas, pero que posee un serpentín de cobre sumergido en un recipiente con agua para la condensación del licor. El rendimiento de este proceso es de aproximadamente 15%.

FIGURA 3.5 "Raspador" utilizado para agrandar la cavidad en el maguey para la producción de aguamiel en Comitán de Domínguez, Chiapas. Fotografía: Orantes-García (2015).

3.4.5. NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

La producción y comercialización formal del comiteco actualmente se limita a unos cuantos casos, siendo la empresa Comiteco Balun Canan S. de R. L. de C. V. (2015) la que cuenta con registro de marca comercial y con venta del producto a nivel estatal, nacional e internacional. Sin embargo, la producción para el autoconsumo es importante en la ciudad de Comitán de Domínguez y en todo el territorio de la Meseta Comiteca, integrada por los municipios de Comitán de Domínguez, como cabecera regional, La Independencia, La Trinitaria, Las Margaritas, Las Rosas, Maravilla Tenejapa y Tzimol, con una superficie de 7,243.5 Km^2, donde en 2013 se estimaba que la población era de aproximadamente 450,440 habitantes (Región XV Meseta Comiteca Tojolabal, 2015), de tal manera que si las familias que poseen al menos un maguey en sus traspatios lo aprovechan para obtener el licor, o incluso si algunos campesinos que cuentan en su solar con alguna planta de agave venden el aguamiel a productores de comiteco a baja escala (Torres-Cristiani, comunicación personal, 2015) y lo comercializan entre sus conocidos, pudiera incrementarse de manera considerable la producción local de la bebida, ya que esta forma de distribución y venta informal juega un papel importante en la región. Para estimar el potencial real de comercialización a nivel local y tal vez extrapolar a los lugares en los que se tienen puntos de venta establecidos, sería interesante implementar encuestas para conocer el consumo promedio de la bebida, como se hizo en su momento con el análisis del potencial de comercialización del bacanora (Salazar-Solano y Mungaray-Lagarda, 2009).

3.4.6 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA DEL COMITECO

El licor comiteco tiene importancia cultural y social. Su elaboración está fuertemente ligada a las tradiciones de la Meseta Comiteca. La producción se sigue conservando en el nivel artesanal, ya que prácticamente se fabrica para autoconsumo por las familias que poseen en su predio alguna planta de agave. La producción industrial se limita

a unos cuantos empresarios. En la Secretaría de Economía del estado de Chiapas se encuentran agrupados bajo el registro de *"Marca Chiapas"*, diez productores que forman la empresa Comiteco Balun Canan S. de R. L. de C. V., quienes han buscado el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) para localizar las zonas agroecológicas óptimas para el cultivo de *A. americana* y así tomar decisiones adecuadas sobre el aprovechamiento de la planta y en consecuencia, la comercialización del licor comiteco.

La bebida (comiteco) tiene importancia cultural y social en la región

Los pequeños productores son los autores del comercio informal del licor y enfrentan problemas con el manejo adecuado y sustentable del agave. En general, se sugiere que tanto los pequeños productores como los productores formales están pasando por una problemática similar a la que sufrieron los productores del bacanora, mezcal y tequila antes de lograr la Denominación de Origen, pero no cabe duda que el licor comiteco, al igual que estas bebidas, posee el potencial para que se establezca tal vez en un plazo no muy largo, la estandarización del proceso de producción y se consolide la comercialización formal.

3.4.7 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

Indudablemente la industrialización de la producción del licor comiteco es aún incipiente y como ya se ha mencionado sólo una empresa formal se dedica a la elaboración industrial de la bebida. Los retos tecnológicos son grandes debido a que no se tiene conocimiento de que exista un plan de manejo para las especies de *Agave* que se han detectado en la Meseta Comiteca. Sin embargo, sí se podrían implementar las acciones documentadas por Illsey *et al.*, (2005) en el informe final del proyecto de conservación *in situ* y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Específicamente para la región del licor comiteco, en 2012, el INIFAP en colaboración con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) hicieron un estudio para determinar las áreas potenciales para el cultivo de agave (*A. americana*) en la Meseta Comiteca. En este estudio se encontró que hay 55,874 hectáreas con potencial óptimo para el cultivo de agave, localizadas en su mayoría en los municipios de Las Margaritas, Comitán de Domínguez y Las Rosas (Reynoso *et al.*, 2012b).

Asimismo, en el Programa Regional de Desarrollo para la Meseta Comiteca existen políticas públicas con programas específicos considerados en el eje de Fomento Económico y Finanzas, en donde una de las principales políticas es la de trabajar por un Chiapas competitivo (Programa Regional de Desarrollo. Región xv Meseta Comiteca Tojolabal, 2015). Con la implementación de estos programas se facilitaría el desarrollo de una industria formal mediante el apoyo a los productores y campesinos, así como al desarrollo agroindustrial y de asesoría, atención empresarial y otros programas considerados en dicho eje. Del mismo modo, el Programa de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica facilitaría la intervención de instituciones educativas y de investigación para el apoyo a esta industria, para que pudiera aprovechar los desarrollos tecnológicos ya existentes de la industria del tequila y del mezcal.

3.4.8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El licor comiteco es una bebida alcohólica derivada de la fermentación y destilación del aguamiel de *Agave americana* mezclado con piloncillo y agua, en la Meseta Comiteca del estado de Chiapas, México.

La bebida tiene importancia cultural y social en la región alcanzando una cierta importancia estatal y nacional gracias a la comercialización por una empresa protegida bajo la marca "*Chiapas*".

La creación de un plan de manejo y aprovechamiento sustentable del agave como materia prima para el licor comiteco, podría facilitar en un mediano plazo la Denominación de Origen, dado que éste es un producto con características únicas ligadas a elementos naturales y sociales de la región en la cual se produce.

SECCIÓN II. BEBIDAS DESTILADAS DE AGAVE

Álvarez-Ainza, M., Arellano-Plaza, M., De la Torre-González, F.J., Gallardo-Valdez, J., García-Barrón, S.E., García-Galaz, A., Gschaedler-Mathis, A., Herrera-López, E.J. López-Miranda, J., Páez-Lerma, J.B., Rentería-Martínez, O., Rodríguez-González, E., Soto-Cruz, N.O., Larralde-Corona, C.P.

RESUMEN

El mezcal es producido en la mayoría de los estados de México, en los cuales la materia prima, el *Agave* spp., crece principalmente en forma silvestre. En los últimos 10 años el mezcal ha alcanzado un reconocimiento nacional e internacional, siendo así la segunda bebida destilada de agave más consumida en nuestro país después del tequila, el cual finalmente también es un mezcal con Denominación de Origen propia. Los trabajos científicos sobre las bebidas destiladas de agave, en especial el mezcal, se han enfocado en el estudio de la composición aromática, caracterización de las diferencias con otras bebidas similares, determinación de patrones de autenticidad y caracterización de la biota microbiana. Pocos trabajos han involucrado el uso de mediciones sensoriales, y mucho menos la evaluación de aspectos hedónicos (nivel de agrado, preferencia, aceptación). Dada su importancia económica y cultural, es necesario comprender, por un lado, la influencia de los factores relacionados con el proceso de fabricación y, por otro lado, los relacionados con el consumo de las bebidas destiladas de agaves, en aras de fortalecer y aportar un beneficio tanto científico como tecnológico a su industria. Dentro de los mezcales tradicionales se encuentran los producidos regionalmente con esa Denominación de Origen, el nombre del estado productor, así como el bacanora, la raicilla y el tequila. En ese apartado se analizan los aspectos más relevantes de la historia, producción y retos tecnológicos específicos para estas bebidas destiladas de agave.

Palabras clave: *Agave, mostos, bebidas destiladas, mezcal, tequila, bacanora, raicilla, microorganismos, industrialización.*

3.5 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las bebidas destiladas conocidas genéricamente como mezcales, son muy populares. Se producen por destilación del mosto fermentado de varias especies de *Agaves* o magueyes. El proceso de elaboración tiene cinco pasos principales: recolección de la materia prima (eliminación de las hojas, dejando el tallo y la base de las hojas, lo que se conoce como cabeza o piña); cocción de las piñas; extracción del mosto; fermentación (espontánea o inducida); destilación y en algunos casos maduración. El tequila difiere de otros mezcales, se produce únicamente con *A. tequilana* Weber var. azul, que crece en las regiones de la Denominación de Origen Tequila (Cedeño-Cruz y Álvarez-Jacobs, 2003; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). La gran variedad de agaves existentes en México, así como sus múltiples usos, han tenido un papel relevante en la identidad cultural del país.

De manera oficial, el mezcal es una bebida alcohólica destilada obtenida por la fermentación (en la mayoría de los casos artesanal) y destilación del jugo de agave cocido, que cuenta con Denominación de Origen, su producción esta regulada por la NOM-070-SCFI-1994. Los estados con denominación son Oaxaca, Guerrero, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato (dos municipios), Tamaulipas (11 municipios), Michoacán (29 municipios) y Puebla (115 municipios) (Consejo Regulador del Mezcal, 2017). Sin embargo, se produce mezcal en 21 de los 32 estados de México (De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Consejo Regulador del Mezcal, 2015). Adicionalmente, son mezcales con Denominación de Origen propia el bacanora y el tequila. Una última bebida, la raicilla, aunque cuenta con una marca colectiva a la fecha no cuenta con Denominación de Origen. Todos los anteriores comparten el proceso de elaboración básico de cocimiento de las piñas de agave, molienda para la extracción del jugo, fermentación (con o sin fibra) y destilación; sin embargo, para cada región y mezcal específico se dan variaciones en el proceso, por ejemplo la o las especies de *Agave* que son utilizadas para su elaboración; el tipo y tiempo de cocimiento de las piñas; la forma en que se obtiene el jugo; los recipientes donde se lleva a cabo la fermentación y el tiempo de duración, el uso o no de inóculos específicos; el tipo del equipo de destilación, el tiempo que dura el proceso, la forma, de destilar y si se realiza o no añejamiento. Todo esto les confiere a los mezcales características organolépticas distintivas que comienzan a ser exploradas de manera científica formal, pero que son claramente reconocibles para los catadores de estos destilados.

3.6 EL MEZCAL

3.6.1 HISTORIA

En la época prehispánica, las bebidas de agave se obtenían mediante la cocción de los corazones de estas plantas; ya cocidos, se machacaban para extraer los jugos, los cuales eran fermentados para ser consumidos, por lo que se presume que antes de la Colonia los indígenas no estaban acostumbrados a tomar bebidas de alto contenido alcohólico. Con la Conquista española se introdujeron los alambiques, con los cuales se realizó la destilación de los mostos para la obtención del vino mezcal, procedimiento que hasta la fecha se continúa llevando a cabo, en la mayoría de los casos (Berumen, 2009). Por definición en la NOM-070-SCFI-2016 el mezcal "es una bebida alcohólica destilada mexicana, 100 % de maguey o agave, obtenida por destilación de jugos fermentados con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos, cosechados en el territorio de Denominación de Origen".

El proceso [...] de elaboración del mezcal inicia cuando el agave alcanza su madurez, (a los 8 años aproximadamente)

3.6.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

El proceso general de elaboración del mezcal inicia cuando el agave alcanza su madurez, (a los 8 años aproximadamente), que es cuando se retiran las hojas y se obtienen los corazones de las plantas los cuales son cocidos en hornos de hoyo o mampostería. En la molienda se obtiene el jugo, que posteriormente se somete a fermentación alcohólica; dependiendo de la región en donde se elabore se puede utilizar bagazo o solamente el jugo. El mosto fermentado con un contenido de etanol de 3 a 6% v/v se destila para obtener el mezcal.

Existen más de 50 diferentes especies de *Agave* empleadas para elaborar mezcal de acuerdo con la región en que se encuentre (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007a). La complejidad del mezcal, no sólo se debe a la especie de *Agave* utilizada, sino también al proceso que se emplea para elaborarlo (herramientas, materiales, microbiota nativa presente en la fermentación, tiempo y temperatura de la fermentación), reflejando una amplia diversidad de características sensoriales, las cuales están ligadas a la región en donde se produce, lo que muestra la importancia cultural y económica de los agaves y del mezcal (Illsey-Granich *et al.*, 2009).

3.6.3 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

» *Mediciones sensoriales*

Pocos trabajos han involucrado el uso de las mediciones sensoriales para el análisis del producto terminado. Dentro de estos trabajos se encuentra el de García-Barrón (2012), en el que se correlacionaron las mediciones sensoriales e instrumentales, para el estudio de mezcales de Oaxaca y San Luis Potosí. Sin embargo, este trabajo se acotó sólo al olor del mezcal y los aspectos de percepción en boca (sabor) no fueron considerados. Actualmente se ha incentivado el uso de redes neuronales en el estudio de diferentes temas relacionados con el mezcal. Estas herramientas están orientadas a la determinación precisa de patrones con base en datos con un elevado valor de incertidumbre. García *et al.,* (2013) diseñaron una red neuronal para la clasificación de mezcales de Oaxaca y San Luis Potosí, a partir de los descriptores de olor generados por un grupo de jueces entrenados. En 2014, los mismos autores reportaron el uso de una red neuronal para identificar segmentos de consumidores a partir de la valoración de diferentes atributos del mezcal encontrando diferentes números de segmentos de acuerdo con la herramienta utilizada para el análisis.

» *Compuestos volátiles*

De León *et al.,* (2006) analizaron diferentes tipos de mezcal de San Luis Potosí, producidos a partir de *Agave salmiana*, utilizando la técnica de micro extracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas. Identificaron 37 compuestos, 9 de ellos clasificados como compuestos mayoritarios. Los resultados sugieren que los mezcales contienen compuestos únicos tales como limoneno y pentil butanoato, los cuales podrían ser usados como indicadores de autenticidad para este tipo de mezcal.

3.6.4. ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA DEL MEZCAL

Ante la diversidad de factores involucrados en el proceso de fabricación, debemos comprender y conocer a fondo su posible influencia sobre la calidad final del mezcal. Dada la creciente demanda de mezcal tanto a nivel nacional como internacional, es necesario contar con mediciones que reflejen fielmente los efectos de los factores de influencia. La mayoría de los trabajos científicos y tecnológicos hasta ahora realizados, se han orientado en el estudio de la composición aromática, caracterización de las diferencias con otras bebidas similares, determinación de patrones de autenticidad y caracterización incipiente de la biota microbiana involucrada en su producción tradicional, especialmente en los procesos espontáneos. Pocos trabajos involucran el uso de mediciones sensoriales, y mucho menos la evaluación de aspectos de agrado, preferencia y aceptación por parte de las personas que consumen mezcal. En función de la importancia económica y cultural, es necesario comprender la influencia de diferentes factores de interés relacionados con los consumidores y las características finales del producto, en aras de fortalecer y aportar un beneficio tanto científico como tecnológico a la industria del agave.

3.7 MEZCAL DE DURANGO

El mezcal es la bebida representativa del estado de Durango, no sólo porque su producción es una actividad económica importante para la entidad, sino también porque forma parte de la identidad cultural de los duranguenses. Gracias a su tradición mezcalera, en 1995 el mezcal consiguió la Denominación de Origen reconociendo a Durango como territorio protegido y productor exclusivo de mezcal.

3.7.1 HISTORIA

Los documentos históricos muestran que el consumo del mezcal en Durango se dio por primera vez entre los pueblos mineros de la Villa de Nombre de Dios (actual municipio de Nombre de Dios). En 1725 el consumo de mezcal se popularizó en toda la región, para ese mismo año se prohibió su venta. Posteriormente el gusto por el mezcal se extendió a los actuales municipios de El Mezquital y Durango. Fue hasta comienzos del siglo XVIII cuando se autorizó la fabricación y sitios para su venta (Corona-Pérez, 2001). Actualmente estos municipios son los principales productores de mezcal en el estado.

3.7.2 INFORMACIÓN TÉCNICA GENERAL

» *Proceso de elaboración*

Para la elaboración del mezcal en este estado se emplea principalmente el *Agave durangensis*, y en menor proporción *A. angustifolia* y *A. maximiliana*. La mayoría

de *A. durangensis* es obtenido a partir de las poblaciones silvestres. La producción de mezcal continúa siendo una actividad artesanal con algunas adecuaciones técnicas, pero conservando en esencia su forma de producción apegada a los sistemas tradicionales. El proceso de producción de mezcal en Durango conserva una gran similitud con el proceso de elaboración artesanal empleado en el estado de Guerrero (Barraza-Soto *et al.*, 2014; Kirchmayr *et al.*, 2014).

3.7.3. NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Los productores de Durango están integrados por 50 vinatas, 10 envasadoras y 3 fábricas, ejidatarios y grupos familiares que participan desde la extracción de la materia prima, destilación y venta del mezcal. El sistema de comercialización de mezcal se realiza de manera directa a los intermediarios y comerciantes detallistas quienes a su vez comercializan este producto al consumidor final. Los niveles de producción han aumentado considerablemente, en el año 2011 la producción anual de mezcal en Durango ascendió a 243,900 litros en donde el municipio de El Mezquital tuvo la mayor participación con 142,700 litros (Rosas-Medina *et al.*, 2013).

3.7.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Se han obtenido varios avances en cuanto al estudio de la producción de mezcal en Durango, por ejemplo, se han determinado algunos de los componentes de las poblaciones de *A. durangesis* (Alamaraz-Abarca *et al.*, 2009), así como realizado la caracterización genética de su población en diversas zonas del estado (Alamaraz-Abarca *et al.*, 2013). Además, se ha analizado la capacidad de germinación de la semilla (Barriada-Bernal *et al.*, 2013) y se han identificado posibles zonas potenciales para su cultivo en el estado (Olivas-Gallegos *et al.*, 2007).

El estudio del proceso de elaboración del mezcal en Durango no se ha quedado atrás, se han identificado los microorganismos nativos involucrados en la etapa de fermentación (Páez-Lerma *et al.*, 2013), y se ha evaluado su aplicación para el desarrollo de un inóculo para mezcal empleando las levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii.*

3.7.5 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS EN DURANGO

La industria del mezcal en Durango enfrenta varios retos relacionados con la transferencia de tecnología y la sustentabilidad. Con la sobreexplotación de la población de agaves silvestres surge la necesidad del uso de métodos sustentables para el desarrollo de plantaciones que permitan la conservación de la especie, el control sobre su calidad y su origen. Por otro lado, la arraigada tradición artesanal en la fabricación del mezcal impacta en la calidad y el volumen de producción; los esfuerzos de los productores por mejorar sus estándares y cumplir con los requerimientos establecidos por los organismos reguladores, ha incrementado el número de productores certificados, no obstante se requiere una mayor participación y asesoría por parte de las instancias correspondientes para lograr la certificación y tecnificación de todos los sectores que participan en la producción de mezcal.

3.8 MEZCAL DE MICHOACÁN

La producción de mezcal en el estado de Michoacán data de más de 400 años. Al igual que en otros estados productores se realizaba de forma clandestina hasta hace apenas unos cuantos años. En un inicio el estado de Michoacán no estuvo dentro de la Denominación de Origen Mezcal (DOM), a pesar de que los procesos de producción son similares a otros estados que se encontraban dentro de ella. El 14 de noviembre de 2006, el gobierno del estado de Michoacán solicitó la modificación de la zona protegida en la Declaratoria de Protección de la Denominación de Origen para que se incluyeran los siguientes municipios pertenecientes a dicho estado: Acuitzio, Aguililla, Ario, Buenavista, Charo, Chinicuila, Coalcomán de Vázquez Pallares, Cotija, Cojumatlán de Régules, Erongarícuaro, La Huacana, Tacámbaro, Turicato, Tzitzio, Hidalgo, Salvador Escalante, Morelia, Madero, Queréndaro, Indaparapeo, Tarímbaro, Tancítaro, Los Reyes, Tepalcatepec, Sahuayo, Marcos Castellanos, Jiquilpan, Venustiano Carranza y Vista Hermosa. En 2013 se publicó la extensión de la Denominación en el Diario Oficial de la Federación, con lo cual los productores actualmente pueden utilizar el nombre *"mezcal"*, y no sólo el término de bebida destilada de agave, el cual no reflejaba la tradición mezcalera de la región.

La producción de mezcal en el estado de Michoacán data de más de 400 años

3.8.1 HISTORIA

El origen del mezcal de Michoacán no tiene una fecha ni ubicación precisa; sin embargo, se ha referido que su producción tiene una antigüedad de más de 400 años. Según investigaciones realizadas por Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villareal (2004), se localizaron vinatas antiguas y se observaron técnicas de producción rudimentarias para realizar la destilación, utilizadas también por productores del sur del estado de Jalisco y de Colima. También Villaseñor-Gómez y León-Yvarra (2006), en su libro "*Villa Madero: Historia de un Pueblo en la Sierra Michoacana*" mencionan que en la hacienda de La Concepción, ubicada en Etúcuaro, se producía mezcal desde el siglo XVI.

3.8.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

» *Colecta del agave*

La elaboración del mezcal se inicia con la cosecha del agave maduro (de 7 a 9 años de edad), al cual se le corta el quiote y se deja por al menos 1 año en el campo con la finalidad de aumentar la concentración de azúcares en las piñas. Posteriormente, se cortan las pencas (proceso conocido como rasurado, jimado o desvirado), con el fin de dejar únicamente las piñas del agave. Las piñas se transportan hasta la

fábrica donde son sometidas a corte, para facilitar su manejo y tener un cocimiento uniforme. Las especies de *Agave* utilizados para producir mezcal en Michoacán son *Agave cupreata*, *A. tequilana* Weber var. azul, *A. angustifolia*, *A. inaequidens* y *A. americana* var. *sahuayensis*.

» *Cocimiento*

Los hornos tradicionales son sistemas artesanales que consisten en una cavidad de 6-12 m de diámetro y de 2-4 m de profundidad calentados con leña que es colocada al fondo, se deja quemar hasta obtener brazas, se le adicionan piedras grandes (principalmente volcánicas) hasta tapar por completo la leña. Cuando las piedras están al rojo vivo se agregan pencas de las piñas cosechadas (para evitar el contacto directo con el agave), se colocan primero las piñas más grandes y al final las más pequeñas. Cuando se ha llenado de piñas, éstas son cubiertas con pencas y costales de ixtle, dejando un orificio al centro del horno. Posteriormente, los costales son tapados completamente con tierra hasta tener un montículo y si acaso es época de lluvia, la tierra es cubierta con lonas de plástico para impedir la entrada de agua. Finalmente, cuando está completamente cubierto el horno se le adicionan 2 o 3 cubetas de agua (40 a 60 L) por el orificio central, mismo que es cubierto después de la adición del agua.

El usar un horno de leña ocasiona que el cocimiento sea más intenso en la parte baja (en la alimentación de la leña) y menor en las partes altas; implicando una diferencia de cocimiento dependiendo de la altura del horno, puesto que mientras las piñas cercanas a las piedras candentes son quemadas, las más alejadas pueden quedar un poco crudas, provocando bajos rendimientos, aunado a que los jugos escurridos durante el cocimiento son absorbidos en la tierra y no son utilizados, las pérdidas pueden ser de más del 30%. La duración del cocimiento es de entre 3 a 8 días.

Piñas de agave listas para el proceso de cocimiento.

» *Molienda*

El proceso de molienda tiene como objetivo desmenuzar los trozos de mayor tamaño de agave cocido para extraer los jugos y facilitar la etapa posterior de fermentación. En el estado de Michoacán se realiza con un pequeño molino de rastrojos o de forma manual, con hacha dentro de una batea o canoa de madera. Cuando se realiza de forma manual incrementa la posibilidad de que los fragmentos de agave no sean desmenuzados completamente y ocasionen bajos rendimientos de extracción de los azúcares.

» *Fermentación*

La fermentación se realiza en tinas hechas con diferentes materiales, entre ellas madera, piedra, tierra, acero, acero inoxidable, etc. La preparación de las tinas se realiza agregando al inicio una determinada cantidad de agave molido (machacado o desmenuzado) y se deja en las tinas por 1 o 2 días hasta obtener un aroma alcohólico. Posteriormente, se le adiciona un poco de agua a temperatura ambiente hasta tapar la tina y se deja fermentar desde 3 hasta 15 días. Las fermentaciones se realizan de forma espontánea, esto es, no adicionan ningún tipo de levadura comercial.

» *Destilación*

En este proceso se separan del mosto los compuestos volátiles como el etanol y congéneres producidos durante la fermentación por levaduras y/o bacterias, y como residuos no volátiles se obtienen vinazas ricas en células muertas, proteínas solubles, sales minerales, fibras de agave, etc. La destilación se realiza en equipos que se componen de una olla generalmente de cobre, la cual es calentada por leña en una hornilla. En la parte superior del alambique se coloca una montera de madera: un cilindro hueco que contiene una olla de cobre la cual se llena con agua fría para condensar los vapores y colectarlos por medio de una canoa interna hecha normalmente con una hoja de agave. El líquido se recolecta en recipientes de vidrio y plástico. La destilación se realiza en dos etapas, el destrozamiento y el rectificado. El producto final que se obtiene tiene entre 50 y 65° Alc/Vol.

3.8.3 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

De acuerdo con cifras del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), en el estado de Michoacán se tienen considerados 29 municipios dentro de la Denominación de Origen a partir de diciembre del 2012. Durante 2013 y 2014 se han incorporado 22 productores de maguey, 23 productores de mezcal, 25 empresas envasadoras y 2 marcas. Debido a su reciente incorporación a la Denominación de Origen la producción en el estado de Michoacán aún es pequeña y durante 2014 sólo se produjo el 0.5% (7,258 L) del mezcal producido a nivel nacional, sin embargo, si consideramos estados productores de mezcal que llevan más tiempo dentro de la Denominación de Origen como son San Luis Potosí, Guanajuato, Durango y Tamaulipas; Michoacán produjo en 2014 más mezcal que todos estos estados. De manera extraoficial sin embargo, se estima

que hay más de 80 fábricas de mezcal y se producen en el estado 400,000 L de mezcal (datos de 2014). La comercialización se realiza de manera informal entre familiares y amigos, algunas veces embotellado con etiqueta pero sin marbete; un volumen considerable de mezcal se vende en botellas de plástico sin etiqueta, lo que ocasiona una mala imagen de la bebida.

3.8.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

La producción de mezcal en el estado de Michoacán se ha transmitido de generación en generación, desde hace más de 400 años. Hasta el momento, pocas empresas tienen un manual de producción en donde se expongan las condiciones y especificaciones de cada etapa durante el proceso de producción de mezcal. Tampoco llevan un seguimiento de las variables que influyen en cada una de las etapas, por lo tanto, desconocen el impacto que tiene el control individual de las variables sobre los rendimientos y eficiencia de los procesos de producción. Sin embargo, algunos productores han recibido capacitación *in situ* para conocer e implementar ciertos controles durante el proceso de producción, como son desarrollo de un inóculo; iniciar la fermentación con una relación constante de agua y agave (que permita una concentración inicial de azúcares entre 10° y 14° Brix); garantizar que el destilado tenga una temperatura inferior a 40°C, y llevar registros de variables como la temperatura, grados Brix, porcentaje de alcohol, volumen, tiempo, etc. Pese a esto, hasta el momento algunos productores sólo han incluido en sus procesos el desarrollo de un inóculo e iniciar la fermentación con 12°Bx. Por ello, es necesario seguir con la capacitación de los productores de manera que ésta les permita mejorar sus procesos de producción.

La producción de mezcal en Michoacán se ha transmitido de generación en generación, desde hace más de 400 años

3.8.5 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

En el estado de Michoacán como ya se mencionó, la producción de mezcal anual es aproximadamente de 400,000 L (según datos extraoficiales), sin embargo, sólo el 1.8% está certificado, lo que implica que la mayoría del mezcal se comercializa de forma clandestina en el mercado informal. Por un lado, muchos de los productores desconocen las especificaciones fisicoquímicas que debe de cumplir el mezcal, así como cuáles son las mejores condiciones de operación que permitan producirlo con un máximo rendimiento y eficiencia. Por lo general los equipos de producción utilizados hoy día en el estado son muy rústicos, y los productores además de desconocer el impacto que tiene las malas prácticas de producción, no cuentan con el equipo necesario de medición que les permita cumplir con la Norma Oficial Mexicana (NOM) del mezcal. Es por esto que la capacitación y

mejora de la infraestructura en las vinatas es indispensable, con la finalidad de garantizar la calidad del mezcal producido.

3.8.6 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

La industrialización actual del mezcal en Michoacán se contempla en vinatas como pequeñas empresas productoras. No se contempla por el momento la instalación de grandes empresas productoras de mezcal, por el contrario, se busca que los productores actuales de mezcal, mejoren sus capacidades y técnicas de producción. En los últimos años se han incorporado los molinos de rastrojo a la etapa de molienda, disminuyendo tiempo y pérdidas por una mala molienda (a diferencia de cuando se muele a mano), lo que ha beneficiado a los productores que han adaptado esta tecnología. Asimismo, varios productores han establecido una etapa de preparación de la levadura antes de la fermentación (desarrollo de un inóculo), lo que disminuye las pérdidas por estancamiento de la fermentación y avinagrado. Sin embargo, la mayoría de las vinatas están situadas en lugares poco accesibles, no tienen servicios de agua, luz, drenaje e incluso caminos; situación que impide utilizar equipos que permitan un máximo de rendimiento en su producción. Las instalaciones son poco salubres, no tienen baños, tampoco están bardeadas para que impidan el ingreso de animales y personas ajenas al proceso. Los tejabanes cuando los tienen, están sucios y de baja altura, las tinas de fermentación están sucias y normalmente no las tapan durante la fermentación, están a nivel del suelo por lo que animales y tierra pueden caer, contaminando los mostos fermentados. El piso de las vinatas por lo general es de tierra, lo cual no es deseado ya que se dificulta la limpieza de la zona de producción.

El cultivo de agaves y la industrialización del mezcal constituyen una importante oportunidad para diversificar las actividades económicas del estado, tanto de las zonas rurales como urbanas, generando empleos directos e indirectos y derrama económica en zonas muy marginadas. Para cumplir con lo anterior, es recomendable establecer por cada vinata las necesidades de los puntos de mejora, iniciando por la infraestructura mínima necesaria que garantice cumplir con las especificaciones fisicoquímicas establecidas en la NOM del mezcal. Posteriormente, la adquisición de equipos que incrementen los rendimientos y eficiencia de producción.

3.9 MEZCAL DE OAXACA

Oaxaca es por mucho el estado con mayor tradición mezcalera, personas y unidades productivas participantes, y su volumen de producción de mezcal es cercano a 97% de la producción nacional. En la actualidad 570 municipios de Oaxaca participan en la producción de este destilado, cubriendo prácticamente todo su territorio. En el año 2015 oficialmente había 422 productores de mezcal, y el registro de 349 marcas (Consejo Regulador del Mezcal, 2015).

3.9.1 HISTORIA

Desde tiempos prehispánicos las plantas de agave, de las cuales se conocen aproximadamente 30 especies que crecen en el territorio oaxaqueño, han sido aprovechadas de manera integral para la producción de pulque, ixtle (cordel), miel, jarcias, dulce, tortillas, calzado, telas, papel, vinagre y para usos medicinales, siendo las localidades de Amatlán, Atatlauca y San Pablo Huitzo, Ixtepeji, Macuilxóchitl, Nejapa y Nochixtlán las de mayor tradición y renombre. Con la llegada de los españoles y del proceso de destilación a finales del siglo XVI, en Oaxaca

se adapta esta técnica de separación, la cual era realizada por los hacendados en alambiques de cobre y por los nativos, con materiales propios de la región, tales como ollas de barro superpuestas y carrizos, para producir de manera familiar el aguardiente de agave. En la actualidad la denominada *"Región del Mezcal Oaxaqueña"*, zona de exclusividad de siembra de agave y producción de mezcal, está compuesta por una gran cantidad de municipios de los distritos de Ejutla, Miahuatlán, Ocotlán, Sola de Vega, Zimatlán y Tlacolula (con un solo municipio, Santiago Matatlán) en donde se produce la mayor cantidad de mezcal (Salvatierra-García, 2003).

3.9.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

En Oaxaca a las unidades de fermentación y destilación se les denomina *"palenques"*, y en general para la elaboración de mezcal se utilizan varias especies de *Agave*, tanto cultivadas como silvestres, dependiendo de la región del estado; destacan el *Agave angustifolia* (espadín), *A. cantala* (cincoañero), *A. macrocantha* (mexicano o barril), *A. marmorata* (tepextate), *A. rhodacantha* (quixe, mexicano o mezcal de monte), *A. americana* var. americana (castilla), *A. karwinskii* (cirial o cuishe), y *A. potatorum* (tobalá); existen además otras especies que son utilizadas para obtención de ixtle, construcción y otros usos, incluso únicamente decorativos (Sánchez-López, 2005).

El proceso de elaboración específico depende la localidad de Oaxaca donde se realice, pero en general en los palenques se lleva a cabo la producción de mezcal bajo el siguiente esquema:

Las piñas seccionadas se cuecen en hornos rudimentarios de forma troncocónica, revestidos de piedra o de material refractario, utilizando de manera tradicional leña, para poner al rojo vivo piedras de bola (o de río) y una vez alcanzado este punto se coloca una cama de bagazo húmedo y encima los pedazos de piñas, se recubre con bagazo seco (o petates), hojas de plátano o incluso plástico, y se cubre con tierra para guardar el calor y cocer las piñas en aproximadamente 3 días.

El agave cocido y caramelizado se muele, desmenuza o desgarra ya sea manualmente (pequeña producción), o mediante la utilización de molinos de piedra (tahona) con tracción animal o eléctrica; el agave molido se coloca con todo y su fibra en las tinas de fermentación, que pueden ser cajones de madera, canoas (tronco de árbol), ollas de barro rojo, o cueros de res, añadiendo cáscara de timbre (*Acacia angustissima*), que es un árbol típico. La fermentación se lleva a cabo de manera natural o espontánea (sin añadir ninguna sustancia), o puede ser acelerada, añadiendo sulfato de amonio.

La destilación del *"tepache"* se realiza con bagazo, ya sea en alambiques de cobre laminado (con o sin deflectores); alambiques de ollas de barro con partes de cobre o de fierro, y el más tradicional, en ollas de barro con carrizo o quiotes. A excepción de los equipos con deflectores, se realiza una rectificación del destilado antes de obtener el producto final con la composición deseable, y al que muchos productores le calculan el grado alcohólico mediante la verificación del *"tamaño de la perla"*, es decir, vertiéndolo a cierta altura con una pipeta de carrizo a un recipiente y observando el tamaño y tiempo de permanencia de las burbujas que se forman.

Una característica distintiva de algunos de los mezcales de Oaxaca es agregarle uno o más gusanos de maguey o gusano rojo (*Hypopta agavis*) al destilado final, con el fin de otorgarle características sensoriales particulares, a éste se le denomina como *"mezcal de gusanito"*. Existe además el *"mezcal de pechuga"* preparado para ocasiones especiales mediante la adición de pechuga de pollo y de gallo capón durante la destilación final del mezcal blanco. Se distinguen por su gusto característico el *"mezcal minero"* (que se prepara con agaves espadín y cirial), el *"mezcal de olla"* (hecho de agave tobalá y en ollas pequeñas), así como diversas cremas de mezcal.

En Oaxaca se produjeron aprox. 2 millones 350 mil litros de mezcal en 2015

3.9.3 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

De acuerdo con cifras reportadas en el informe 2015 del Consejo Regulador del Mezcal, en Oaxaca se produjeron aproximadamente 2 millones 350 mil litros de mezcal en 2015, del tipo I según la norma de 1994 (es decir, 100% agave) y con un promedio de 43.7% Alc/Vol. De este gran volumen de producción, aproximadamente millón y medio de litros, preponderantemente tipo mezcal joven, son exportados a 48 diferentes países (siendo EUA el principal comprador con 64% del mercado), por lo que la mayoría del mezcal que se conoce en el extranjero es de origen oaxaqueño y 100% de agave.

3.9.4. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Dada su diversidad de microambientes, condiciones climáticas, disponibilidad de agua y las diferentes especies de *Agave* y otros recursos naturales, la producción de mezcal en Oaxaca es preponderantemente artesanal, con variaciones en cada una de las etapas de producción en cada palenque. Una de las características comunes de la producción es fermentar incluyendo la fibra y el uso de ollas de barro en algunas etapas, ya sea propiamente en la fermentación o durante la destilación, lo cual le da características organolépticas únicas a este mezcal.

3.9.5. ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

La producción de mezcal involucra tres actividades productivas bien diferenciadas, los productores de agaves, los palenqueros destiladores, y los envasadores/comercializadores; cada uno de estos sectores presenta una gran cantidad de problemas específicos, técnicos y legales. Al igual que en otras regiones del país, pero de manera más grave por el gran volumen de mezcal que se produce, Oaxaca presenta serios problemas de erosión y pérdida de su biodiversidad en general debido a la destrucción de la selva baja caducifolia para plantaciones comerciales de agaves, uso de terrenos con pendientes mayores a 15° que promueven la erosión del suelo lo que, aunado a las prácticas agrícolas tradicionales de roza, tumba y quema, contribuyen a la aparición subsecuente de plagas, principalmente del picudo del maguey o picudo negro (*Scyphophorus interstitialis*), belatobe o chinicuil (*Hypopta agavis*), escama (*Aonidiella* sp. y *Aspidiotus* sp.), así como el denominado piojo harinoso (*Pseudococcus agavis*); también se presentan enfermedades bacterianas (secazón causada por *Erwinia* sp.) y fúngicas tales como punta seca o gomosis (*Fusarium* sp.) , antracnosis (*Colletotrichum agaves*), manchado necrótico (*Alternaria* sp.), mancha púrpura, ahorcamiento y mancha negra (Sánchez-López, 2005). Todos estos problemas fitosanitarios requieren de la modernización de las prácticas agroecológicas, capacitación técnica y acceso a insumos. Otro de los problemas graves que afectan a los productores de magueyes y palenqueros es la escasez de agua en el estado de Oaxaca, y la poca o nula optimización y tratamiento de la que se encuentra disponible.

3.9.6. INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI, 2013), el estado de Oaxaca presenta un alto grado de marginación y desigualdad social; nivel de escolaridad promedio menor a 5.7 años (debajo de la media nacional de 7.5 años). Dado que el sector manufacturero del mezcal es el menos desarrollado hablando tecnológicamente, en varios de los distritos dentro de la Denominación de Origen se observa incluso un decremento en la población en general, dada la alta tasa de migración en búsqueda de oportunidad laborales en otras regiones o estados, especialmente entre los campesinos de temporal y productores de magueyes, en su mayoría indígenas con muy poca tenencia de terreno y que en general no ven esta producción como una actividad productiva principal. Como actividad agroindustrial, la producción de mezcal en Oaxaca requiere, como se ha venido dando en los últimos 10 años, de un apoyo decidido por parte del gobierno para impulsar los tres niveles de productores (magueyeros, palenqueros y comercializadores), así como la modernización y optimización de las prácticas productivas de cada uno de ellos, pero sin perder su carácter artesanal y arraigo con las comunidades productoras tradicionales.

3.10 MEZCAL DE SAN LUIS POTOSÍ

3.10.1 HISTORIA

En San Luis Potosí el área histórica de producción de mezcal abarca 17 municipios, entre los cuales se encuentra Ahualulco, Charchas y Salinas, y al igual que en Zacatecas, con quien geográfica y biológicamente forma una sola región, la producción de mezcal siempre ha estado ligada a la presencia de haciendas ganaderas y mezcaleras, algunas de las cuales retomaron sus actividades en los años noventa después de un largo período de inactividad productiva.

En San Luis Potosí la especie de Agave que se utiliza para la producción de mezcal es Agave salmiana

3.10.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

En el estado de San Luis Potosí la especie de *Agave* que se utiliza para la producción de mezcal es *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, la cual crece de manera abundante y silvestre en todo el Altiplano potosino-zacatecano. El proceso de producción es en general del tipo tradicional, conforme se hacía en antaño en las haciendas mezcaleras. Las piñas se cuecen enteras (sin trozar como en otras regiones del país) en hornos de mampostería calentados con vapor, y que tienen en el piso tablones por donde fluyen durante las primeras 16 horas los jugos amargos ricos en saponinas, que son desechados. En las siguientes horas y hasta aproximadamente las 36 horas de cocimiento se obtiene otra fracción que ocasionalmente se concentra y añade al mosto de fermentación. Una vez cocidas, las piñas son trozadas y el jugo se extrae en un molino de piedra amonedada con piso de sillar acanalado y ligeramente inclinado, para facilitar la recolección de los jugos, y el cual es accionado por un tractor. El bagazo resultante es enjuagado en pilas y pasado por una prensa de tornillo, para aprovechar al máximo los jugos adheridos a las fibras, aunque en algunas fábricas sí se añade el bagazo al jugo o mosto. La fermentación se lleva a cabo en pilas de mampostería abiertas, e inoculada con un caldo de fermento suplementado con nitrógeno, y se calienta con serpentines para alcanzar una temperatura de 30 a 35°C. La fermentación se considera que ha terminado cuando disminuye la cantidad de espuma en la superficie de la pila, y pasa entonces el producto a ser destilado en alambiques de cobre de la manera tradicional (Godínez-Hernández, 2012).

3.10.3. NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

De acuerdo a cifras reportadas en el informe 2015 del Consejo Regulador del Mezcal, en ese año sólo se tenían 3 productores de magueyes registrados, un total de 7 vinatas

y 8 envasadores, con lo cual se produjo en San Luis Potosí 0.2% del volumen nacional, lo que equivale aproximadamente a 30 mil litros, con un total de 7 marcas registradas. Es decir, si bien en el estado de San Luis Potosí hay una gran tradición de producción de mezcal, el volumen de producción está muy por debajo de su capacidad instalada, y solamente se exporta el 0.5 % de su producción (CRM, 2015).

3.10.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Los mezcales de San Luis Potosí han sido analizados por De León *et al.,* (2006, 2008) en cuanto a la composición del destilado, y para tratar de correlacionar su perfil de volátiles con una manera de autenticar su procedencia. Algunos resultados han sido importantes pero no definitivos para distinguir a las bebidas destiladas de agave de diferentes orígenes (especies de *Agave*), aunque sí han servido para distinguir las que han sido adulteradas. También es posible encontrar algunos reportes en cuanto al análisis de la eficiencia de producción de mezcal en vinatas específicas (Godínez-Hernández, 2012).

3.10.5 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

Al igual que en muchos de los estados donde se produce mezcal, en San Luis Potosí se reporta la falta de manejo riguroso agro-ecológico de la producción de las magueyeras y determinación rigurosa de la calidad de la materia prima que se utiliza en cada lote, así como la falta de estandarización y control racional y con instrumentos y metodologías estandarizadas y reguladas de las cuatro fases principales de la producción de la bebida, cocción de las piñas, molienda, fermentación del mosto y destilación (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001).

3.10.6. INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

Los problemas tecnológicos que se presentan en las mezcaleras de San Luis Potosí han sido parcialmente estudiados tanto por personal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) como por investigadores de la propia Universidad Autónoma de San Luis Potosí, quienes han investigado principalmente aspectos de la hidrólisis de las piñas, el contenido de azúcares en los diferentes manejos pre-recolecta que se le dan a los magueyes, así como la eficiencia de la fermentación, la cual estuvo relacionada, entre otros factores, con un alto contenido de saponinas en los mostos y la falta de levaduras que soportaran dichos compuestos, y que además estuvieran en suficiente concentración. Se han abordado además aspectos de la eficiencia sobre la cocción y el tipo de horno utilizado, e independientemente de la configuración del mismo, se logró observar una baja eficiencia de cocción, de alrededor de 50% (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001). Este último hecho parece ser un problema común en todas las unidades productoras de mezcal del país, y que habría que abordar de manera racional y urgente.

3.11 MEZCAL DE TAMAULIPAS

3.11.1 HISTORIA

En Tamaulipas el mezcal se elabora principalmente de manera artesanal en vinatas, para consumo propio y para ayudar a la economía familiar mediante la venta. Se produce en los 11 municipios de este estado considerados dentro de la Denominación de Origen y que contienen a San Carlos, San Nicolás, Burgos, Jaumave, Palmillas, Miquihuana, Bustamante, Tula, Cruillas, Jiménez y Méndez, siendo los tres primeros los de mayor importancia en volumen de producción. Para la elaboración del mezcal se hace uso de varias especies de *Agave*, por ejemplo *Agave angustifolia* (espadín), *A. americana*, *Agave montium-sancticaroli* (jarcia) y *Agave asperrima*, entre otros.

3.11.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

El proceso de elaboración es similar a los descritos anteriormente para los estados de Durango y Michoacán, y hacia el final del proceso de fermentación los mostos se vierten dentro de alambiques simples de destilación, donde también se realiza su rectificación (Jacques-Hernández *et al.*, 2004).

3.11.3 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

El gobierno de Tamaulipas desde hace una década trata de impulsar la agroindustria del mezcal, principalmente con la modernización y terminación de las fábricas de mezcal existentes, la certificación de las mismas, así como promoción y comercialización del mezcal para lograr el posicionamiento nacional e internacional (COMERCAM, 2008), con miras en aprovechar su posición geográfica con el mercado consumidor más grande, Estados Unidos de Norteamérica. De acuerdo a Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal (2007) "aunque incipiente, el mezcal posee amplias perspectivas con impacto social y económico para las entidades rurales comparado con otros destilados de agave, ésta es una bebida que conserva la tradición de fabricación en empresas pequeñas con tradición, cultura e historia fomentando el arraigo de las comunidades". Sin embargo, hasta 2015, solamente se reportaban 9 productores de mezcal registrados, y 4 marcas tamaulipecas comercializadas (Consejo Regulador del Mezcal, 2015).

3.11.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO Y PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

Dada la forma rústica utilizada en el proceso de elaboración del mezcal, en el estado de Tamaulipas las condiciones de proceso son muy variables, ya que las piñas recolectadas de manera silvestre son cocidas, principalmente en hornos de piso, y prensadas mediante trapiches azucareros, obteniendo así el jugo o mosto que es fermentado, diluido con dos a tres volúmenes de agua, y generalmente de forma espontánea, en contenedores o tanques de plástico, madera o en algunos casos acero inoxidable, durante cinco a nueve días (dependiendo de la temperatura ambiente, la cual oscila entre los 25°C y 42°C), realizando el seguimiento a la fermentación mediante parámetros visuales tales como la producción de espuma. Esto conlleva un limitado nivel de control del proceso y alta variabilidad entre lotes.

3.11.5 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

La producción de mezcal en el estado de Tamaulipas requiere un inminente apoyo para sus productores rústicos o artesanales, ya que hasta 2015 el número registrados ante el Consejo Regulador del Mezcal era de 7, cifra debajo del número de municipios incluidos en la Denominación de Origen. Es indispensable sin lugar a dudas un mayor impulso y actualización tecnológica.

3.12 MEZCAL DE ZACATECAS

3.12.1 HISTORIA

La producción de mezcal en Zacatecas se divide en dos regiones, los cañones de Tlaltenango y Juchipila, que comprende los municipios de Trinidad García de la Cadena, Teúl de González Ortega, Jalpa y Juchipila en las cuales se utiliza como materia prima el *Agave tequilana* Weber var. azul, y la región denominada de los Pinos, que incluye a los municipios de Pinos y Villa Hidalgo. Esta segunda región se encuentra localizada en el sur del estado en el Altiplano potosino-zacatecano, donde se aprovecha principalmente el *Agave salmiana* sp. *crassispina*. (López-Nava *et al.*, 2012).

3.12.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

Existen dos tipos de fábricas de mezcal en este estado, las que se localizan en cascos de haciendas, y que tienen hornos de piedra, tahonas, calderas de carbón, prensas y pilas para fermentación, y las que cuentan con mayor equipamiento, molinos de trapiche, tinas y alambiques de acero inoxidable (Plan Rector Sistema Nacional Maguey Mezcal, 2005).

El estado de Zacatecas produce mezcal 100% agave, que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las piñas maduras de los agaves, sin mezclar otro tipo de azúcares. También en este estado se produce el mezcal tipo II u 80/20, que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros azúcares permitidos.

3.12.3 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Zacatecas presenta el segundo lugar de producción de mezcal a nivel nacional. En el año 2000 contribuyó en la producción de mezcal con 2.5 millones de litros, que representaron 16.8% de la oferta total de ese año. En el año 2011 la producción de mezcal llegó a 22.2% de la producción nacional; sin embargo, ésta decreció drásticamente a 4.5 y 0.1% en los años 2012 y 2013, respetivamente, para tener una ligera recuperación a 4.4% durante 2014 (Consejo Regulador del Mezcal, 2015). De igual manera el envasado del mezcal en Zacatecas en el año 2011 fue del 19% del envasado nacional total, pero disminuyó a 11% en 2012 y a 3.4% en 2013, para posteriormente mostrar una recuperación al 6.2% en 2014.

Actualmente los 58 municipios del estado de Zacatecas están dentro de la Denominación de Origen Mezcal. La entidad cuenta con aproximadamente 1000 productores de agave y 22 fábricas que elaboran 60 tipos de mezcales (López-Nava *et al.*, 2014).

3.12.4. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO Y PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA

En una asistencia técnica que realizó el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), en el año 1998 en cinco empresas del estado de Zacatecas (Pinal-Zuazo, 1998-1999) se detectó que algunas fábricas no desarrollaban un inóculo, por lo cual la población microbiana inicial en las tinas de fermentación era baja, propiciando una fase de adaptación más larga. No se controlaba la concentración inicial de azúcares en el mosto, ni la temperatura de las tinas ocasionando variabilidad del producto. En ocasiones el aporte de la fuente de nitrógeno era insuficiente. Se detectó en el mezcal tipo II que la concentración de otros azúcares no respetaba, en ocasiones, lo estipulado por la norma del mezcal. Durante la asistencia técnica los productores recibieron capacitación y sugerencias que les permitieron estandarizar e incrementar los rendimientos en sus tinas de fermentación.

Zacatecas presenta el segundo lugar de producción de mezcal a nivel nacional

3.12.5 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS

La producción de mezcal en Zacatecas ha disminuido en los últimos años, lo cual puede deberse a que los productores de agaves tienen perdidas económicas (García-Salazar y Macías-Rodríguez, 2010). No obstante, tal estado tiene un gran potencial en la producción de mezcal, y de hecho entre 2009 y 2010 las exportaciones de mezcal en el país se incrementaron en un 54.3% a países como Estados Unidos de América, Australia, Chile, España, Inglaterra, Canadá, Perú, Ecuador y Nueva Zelanda (Moreno, 2011), a causa de diversos factores, como la incursión en nuevos mercados y las actividades de promoción que realiza la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

3.13 EL BACANORA

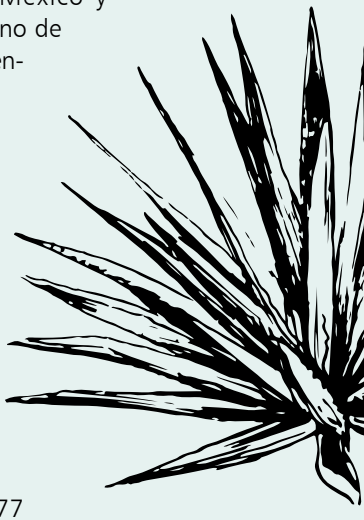
El bacanora es una bebida regional destilada de *Agave angustifolia*, elaborada de manera artesanal y que forma parte de las tradiciones culturales del estado de Sonora. El bacanora, "*vitzo*" o "*cuviso*", como lo llamaron los ópatas, indígenas de la región, es comparado con los mejores destilados de México. Actualmente está protegida por la Denominación de Origen publicada en el Diario Oficial de la Federación en noviembre de 2000, la cual comprende a 35 municipios del estado de Sonora (Armenta *et al.*, 2003; Diario Oficial de la Federación, 2000; Moreno, 1998; Núñez, 2001; Yanes, 2003).

El *A. angustifolia* es la especie con mayor distribución entre los agaves en América del Norte. La parte aprovechable para la elaboración del bacanora es el tallo y base de sus hojas (piña o cabeza), ya que es donde se encuentran los carbohidratos almacenados por la planta (Núñez, 2003a).

Según la NOM-168-SCFI-2004, se denomina como *"Bacanora 100% agave"* al que se obtiene de manera artesanal por destilación y rectificación de caldos, preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos en la molienda de las cabezas maduras de agave. Primeramente, se hidrolizan por cocimiento y se someten a fermentación alcohólica principalmente por levaduras naturales o nativas. De acuerdo con su tipo, el bacanora es un líquido incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble o encino (Núñez, 2003b). No existen publicaciones en las cuales se describa la composición química de la bebida, pero sí hay referencias en las que se evidencia el apego en la composición de la bebida con lo establecido en la NOM-168-SCFI-2004 (Álvarez-Ainza *et al.,* 2013).

3.13.1 HISTORIA

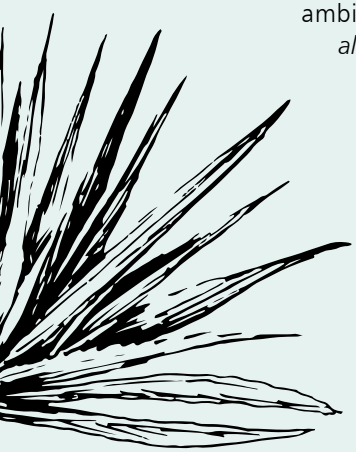
El bacanora es parte de la cultura sonorense desde los tiempos de la Conquista. Es uno de los tres destilados de agave más importantes de México y obtiene el nombre de uno de los municipios pertenecientes a la Denominación de Origen, situado en la Sierra Centro, al este de Hermosillo, capital del estado de Sonora. De 1915 a 1992, la elaboración de la bebida fue prohibida y se convirtió en una práctica clandestina. Lo anterior orilló a que la industria del bacanora durante 77 años no se pudiera desarrollar, ni se generaran los conocimientos requeridos para impulsar procesos eficientes y competitivos en su elaboración (Núñez, 2003b).



3.13.2 PROCESO DE ELABORACIÓN

La zona tradicional de producción de bacanora abarca un territorio amplio, en el cual se incluyen 35 municipios situados dentro de la Denominación de Origen (Armenta, 2003; Núñez, 2003b). La elaboración del

bacanora tradicional o artesanal se lleva a cabo utilizando agave silvestre (*A. angustifolia*), realizando una cocción o *"tatema"* de la piña de agave en hornos rudimentarios, subterráneos, cubiertos con lámina de metal y tierra. Enseguida se hace una molienda con mazos o palos de madera, para posteriormente realizar la fermentación en barriles rudimentarios con capacidad de 200 litros, donde se deja reposar, de 4 a 7 días, según la temperatura ambiental (Álvarez-Ainza *et al.*, 2009; Armenta, 2003; Núñez, 2003b).



El fermento se destila en barriles metálicos, calentados con leña de mezquite para lo cual se utiliza un sombrero y serpentina de cobre muy rudimentarios. Una vez que hierve, se cubre el tambor y se sella con lodo, para evitar cualquier fuga de vapores, al terminar se desecha el bagazo y el producto obtenido se somete a una segunda destilación, de la cual se obtienen tres porciones: cabeza, medio y cola. La parte deseable es la media. Sin embargo, al mezclarse una porción de la cabeza y cola se obtiene un producto que tiene un contenido de alcohol que oscila entre los 40º y los 50º Alc/Vol, aunque esto no es una práctica deseable, ya que la cabeza es rica en metanol (Núñez, 2003b).

3.13.3 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

Hasta hace pocos años la producción de bacanora era muy limitada, y se destinaba al autoconsumo y a la comercialización local, obteniendo una bebida de calidad buena o alta, con fuertes variaciones en sus características organolépticas, en función del toque particular que cada productor le otorgaba. Actualmente no existe una producción industrial de bacanora como tal, pero algunos productores, tienen variantes en la elaboración, como el tipo de maguey que utilizan (cultivado o silvestre) lo que diferencia el proceso artesanal. También se han observado cambios en cuanto a cómo es la cocción y cómo se muelen las cabezas de agave (Núñez, 2003a). Existen pocos productores que se dedican a la comercialización de esta bebida, la cual logra salir del estado y del país logrando ser reconocida.

3.13.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Debido a la prohibición en la elaboración de la bebida (77 años), los estudios sobre bacanora son escasos. No obstante se ha propuesto que para alcanzar un proceso industrializado con un producto de buena calidad, es necesario que se aíslen y utilicen levaduras nativas de la zona de Denominación de Origen (Álvarez-Ainza *et al.*, 2009), en este contexto se han realizado estudios donde se aislaron cepas de fermentaciones naturales de diferentes lugares de la Denominación de Origen, donde se lograron aislar 228 cepas de *Saccharomyces*

cerevisiae según la caracterización fenotípica, las cuales según la bibliografía son la mejor especie para procesos fermentativos, posteriormente según el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción de la región ITS1-5.8S-ITS2 se lograron identificar especies de levaduras diferentes de *S. cerevisiae* (Álvarez-Ainza *et al.*, 2015). Con base en lo anterior surgió la inquietud de evaluar cepas diferentes a *S. cerevisiae* pero con características similares a esta especie, evaluando monocultivos y cultivos mixtos de cepas en jugos de agave para la fermentación de bacanora (Álvarez-Ainza, 2015; Luévano-Martínez, 2010). Por otra parte, se han analizado los compuestos volátiles mayoritarios en muestras colectadas en la zona de Denominación de Origen para esta bebida y se ha encontrado una gran diversidad entre los diferentes perfiles obtenidos, incluso 44.2% de las muestras analizadas se encontraba con parámetros fuera de lo establecido por la NOM-168-SCFI-2004 (Álvarez-Ainza *et al.*, 2013). Asimismo, al comparar bebidas comerciales y artesanales no se logró observar ninguna diferencia, lo cual se puede explicar por la falta de tecnificación en los procesos (Rodríguez-Córdova, 2015). En los compuestos minoritarios también se encontró una gran variabilidad entre diferentes muestras analizadas y esto también se reflejó en la variabilidad de la aceptación por panelistas entrenados en el análisis sensorial (Álvarez-Ainza *et al.*, 2015). Lo anterior permite inferir que se requieren más estudios sobre la bebida y su proceso de elaboración, y sobre todo capacitar constantemente a los productores artesanales para generar un producto homogéneo y de calidad en la zona de Denominación de Origen.

3.13.5 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA DEL BACANORA

Son pocos los estudios que existen en cuanto a la composición química de la bebida, así como su apego con las especificaciones descritas en la NOM-168-SCFI-2004. De la misma forma, existe muy poca información sobre la dinámica microbiana que ocurre durante la fermentación. No existe información publicada acerca de los compuestos que brindan las características organolépticas que hacen del bacanora una bebida característica y diferente a otras bebidas. Desde la perspectiva de los productores, existen muy pocos programas que apoyan la transformación del proceso para pasar de ser una práctica artesanal hasta ser una práctica industrial. A su vez son escasos los apoyos que existen para conocer e implementar las buenas prácticas de producción. Y debido a la sobreexplotación del agave en los últimos años existe también el problema de una deforestación de la planta en casi toda la región de Denominación de Origen de esta bebida (Armenta, 2003; Kolendo, 2002; Núñez, 2003b).

3.13.6 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS DEL BACANORA

Actualmente el nivel de industrialización es muy bajo comparado con otras bebidas destiladas de agave. Faltan estudios que visualicen cuáles serían las mejores estrategias de industrialización para esta bebida, ya que son pocos los productores que se aventuran a hacerlo. Asimismo, es necesaria la vinculación entre investigadores y productores para realizar estudios con la finalidad de mejorar el procesamiento en

la fabricación de esta bebida. La carencia de infraestructura, por lo menos en el nivel de planta piloto para elaborar bacanora, es el común denominador para la mayoría de los productores artesanales quienes no poseen el acceso a una infraestructura que les permita tener una producción controlada de la bebida.

Con la información descrita se concluye que se necesitan más estudios tanto socio-económicos, de ciencias básicas y tecnológicas, para lograr que esta bebida sea un ícono del estado de Sonora y logre el reconocimiento en otras escalas. De igual forma, innovando en los procesos de producción se logrará aumentar la producción y comercialización de bacanora.

3.14 LA RAICILLA

Agave lechuguilla, una de las especies de *Agave* utilizados en la elaboración de raicilla.

La raicilla se ha producido desde el siglo XVI y comenzó a comercializarse a principios del siglo XVII. Era la bebida de los mineros que trabajaban en las montañas de la Sierra Madre Occidental de Jalisco. Aunque oficialmente es un mezcal, fue rebautizado como raicilla para evitar impuestos establecidos por el gobierno colonial.

3.14.1 HISTORIA

Durante años, la raicilla se vendía en operaciones clandestinas en las montañas; hasta 1997, año en el que el Ing. Jorge Dueñas y productores de raicilla, formaron el Consejo Mexicano Promotor de la Raicilla (CMPR), el cual encabeza la Marca Colectiva *"Raicilla Jalisco"*. Los productores más conocidos se encuentran en la región Costa, la cual comprende Atenguillo, Cuautla, Guachinango, Mascota, San Sebastián del Oeste, Mixtlán, Talpa de Allende, Atengo, Ayutla, Cabo Corrientes, Chiquilistlán, Juchitlán, Puerto Vallarta, Tecolotlán, Tenamaxtlán, Cimarrón Chico de la Raicilla y Tomatlán, entre otros. Hasta ahora la explotación del *Agave lechuguilla* es silvestre, pero existen plantaciones desde hace siete años en las que ya se domesticó la planta, y es probable que se inicien cosechas de un agave controlado. Esto último favorecería al rápido crecimiento de este tipo de bebida y daría pie al desarrollo de las regiones en las que se produce. Hasta el año 2008 la explotación de *A. inaequidens* y *A. maximiliana* fue silvestre y a partir del año 2009 se inició la cosecha de las parcelas donde se domesticaron estas variedades de *Agave*. Una de las características principales de este producto es que su producción sigue siendo artesanal. Su origen se dio en las minas, por lo que su consumo se hacía de manera muy local y no logró darse a conocer de forma en que pudiera expandirse a mayor escala; además se dice que las regiones donde se elaboraba son de difícil acceso.

3.14.2 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

En 2014 la producción de raicilla fue de 50 mil litros con cerca de 70 productores tradicionales. Actualmente se tienen alrededor de 26 marcas registradas de raicilla, la cual comprende Cabo Corrientes, Don Chalío, El Real, Guadalajareña, Hacienda El Divisadero, Jalisco, Juan Dueñas, La Gorupa, La Venenosa, Las Praderas, Rancho El Cono, Republic, Sierra del Mosco, Tenanchi, entre otros.

3.14.3 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Actualmente las fábricas de raicilla llamadas *"tabernas"*, son rústicas y no tienen la infraestructura adecuada de una empresa moderna. Los procesos actuales se definen a continuación:

» *Jima*

Consiste en separar de la piña las pencas de agave cuando éste ha alcanzado el desarrollo adecuado para su industrialización. Los agaves se cosechan en campo, ahí son jimados (rasurado) al ras de la piña para su envío a la planta productora. Las piñas se reciben en el patio de maniobras donde se pesan y cortan en partes más pequeñas de unos 25 kg; una vez reducida, están preparadas para el cocimiento. En algunas empresas productoras de raicilla agregan otros agaves, generalmente *Agave*

valenciana, como fuente de jugos para destilar raicilla, pero es una planta que se ha protegido porque es una especie en peligro de extinción.

» *Cocimiento (hidrólisis), desgarrado y fermentación*

El cocimiento se realiza en un horno de mampostería de forma geométrica de media esfera (tipo iglú) con puerta en la parte superior para cargar las piñas y leña y permitir la salida de humos (chimenea); en la parte inferior se tiene una puerta para la descarga del agave cocido. Para preparar el horno de cocimiento se carga leña, enseguida se colocan las piñas en trozos y se cierra el horno para mantener el calor. Una vez terminado el tiempo de cocimiento, se abre el horno y se deja reposar, de esta forma se acelera el enfriamiento. Se procede a descargar manualmente con ayuda de ganchos. El objetivo del cocimiento es transformar los fructanos contenidos en el agave en azúcares fermentables por medio de la temperatura en el medio ácido natural del agave. Para el desgarrado éste se pasa por una desgarradora, donde es recibido en tanques de 200 litros. El objetivo principal es aumentar la superficie de exposición y mejorar los procesos del siguiente proceso. Después se realiza la fermentación, agregando agua al tanque que contiene la fibra obtenida del desgarrado de las piñas, hasta ajustar la concentración de azúcares. La fermentación es espontánea y puede durar varios días; se deja hasta encontrar la conversión de los azúcares fermentables de la raicilla en etanol principalmente, y en otra serie de compuestos químicos que le proporcionarán atributos sensoriales.

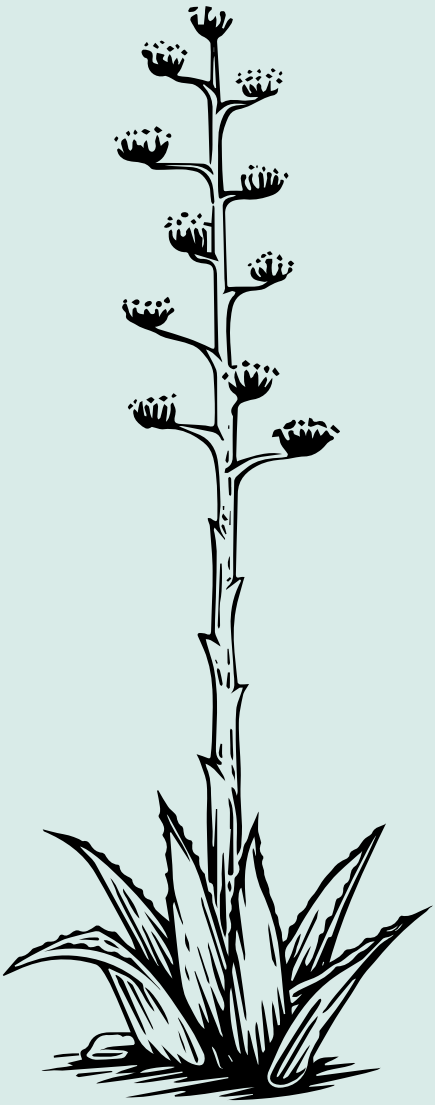
» *Destilación*

Se hace en alambiques de madera provistos de una olla donde se coloca el mosto producto de la fermentación, y una parte cilíndrica con un cono invertido de acero que sirve de condensador, se llena de agua en la parte interna del cono y por la parte externa se condensa el producto, este último se recibe por medio de un tubo de carrizo que va hacia fuera de la parte cilíndrica para ser acumulado en recipientes de almacenamiento. A diferencia de otras bebidas alcohólicas derivadas de agave, se hace una sola destilación con el mismo bagazo del agave. Para el envasado, el objetivo principal de la formulación es la dilución del producto destilado con agua desmineralizada hasta 40% de etanol en volumen, el mezclado con otros lotes de destilado, la adición de aditivo alimentario autorizado (color caramelo principalmente) por la NOM-142 SSA y la filtración en cartuchos. Una vez que se tiene ya ajustado el producto al grado alcohólico y filtrado adecuadamente, el producto es envasado con una llenadora manual en botellas de vidrio con una capacidad de 1 litro o 750 mililitros.

3.14.4 INDUSTRIALIZACIÓN Y RETOS TECNOLÓGICOS EN LA RAICILLA

Es necesaria la construcción de tabernas mecanizadas, sin que esto impida producir raicilla de manera artesanal, mejorar aquellas operaciones que faciliten el trabajo, aseguren la higiene y proporcionen seguridad tanto para quienes realizan el proceso de producción de la bebida, como para el consumidor final.

3.15 EL TEQUILA



El tequila pertenece a la gran familia de los mezcales, término genérico para llamar las bebidas destiladas obtenidas a partir de diferentes especies de *Agave*. El tequila es sin lugar a duda la bebida emblemática de México. De un consumo regional y una producción confidencial, desde hace 30 años se ha convertido en una bebida de renombre que se exporta a nivel internacional con una producción récord en 2008, de más de 300 millones de litros. Varios factores contribuyeron a este importante desarrollo como el establecimiento de una Denominación de Origen (la primera otorgada en México), (NOM-006-SCFI 2012), una internacionalización de la industria, un Consejo Regulador del Tequila que cuida la calidad y la autenticidad, y una Cámara Nacional de la Industria Tequilera que promueve entre otras cosas esta bebida, sobre todo fuera del país. En este sentido, las denominaciones de origen mexicanas se encuentran protegidas y registradas internacionalmente. El tequila está registrado desde el 13 de abril de 1978.

3.15.1 DEFINICIÓN

El tequila se define por la NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones como "una 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 var. 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 en la presente norma y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío. El tequila es un líquido que puede tener color, cuando sea madurado, abocado, o añadido de un color específico".

El tequila se clasifica en dos grandes categorías, tequila 100% (los azúcares fermentados provienen únicamente del *Agave tequilana* Weber var. azul) y el tequila en donde hasta 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa provienen de otra fuente (excepto otras especies de *Agave*). De los azúcares restantes, 51% debe de provenir del *Agave tequilana* Weber var. azul.

Cada una de estas categorías se puede dividir en cinco clases que se definen a continuación:

- **Blanco o Plata:** producto transparente pero no necesariamente incoloro, sin abocante, añadiendo únicamente agua de dilución, pudiendo tener una maduración menor a dos meses en recipientes de roble o encino.
- **Joven u Oro:** producto resultante de la mezcla de tequila blanco con tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejos. También se denomina *"tequila joven"* u oro al producto resultante de la mezcla de tequila blanco con algunos ingredientes que se conocen como abocamiento.
- **Reposado:** producto que puede ser abocado o no, madurado por lo menos dos meses en recipientes de roble o encino. Su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- **Añejo:** producto que puede ser abocado o no, madurado por lo menos un año en recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- **Extra añejo:** producto que puede ser abocado o no, madurado por lo menos tres años en recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

3.15.2 HISTORIA

El origen de la bebida se remonta a la época prehispánica, los códices reportan la existencia de los agaves y diferentes usos. El más importante es el Códice Tonalámatl de Aubin, el cual reporta que algunas tribus aprendieron a cocer el agave y utilizarlo como alimento, además de que el agave desmenuzado puesto en agua producía una bebida fermentada. En estos tiempos estas bebidas no se destilaban y fue hasta la llegada de los españoles que se inició el proceso de destilación y la obtención de una bebida parecida al tequila que conocemos hoy en día (Cedeño-Cruz y Álvarez-Jacobs, 2003).

3.15.3 INFORMACIÓN TÉCNICA GENERAL

A continuación, se describe de manera general el proceso de producción del tequila.

» *Materia prima*

En el caso específico de la elaboración del tequila la única especie autorizada como materia prima es el *Agave tequilana* Weber var. azul y éste debe crecer en la zona de Denominación de Origen. Estos agaves siempre son cultivados ya que no existe el *A. tequilana* en forma silvestre. La propagación vegetativa se realiza utilizando los hijuelos producidos por las plantas madres, cuyo momento de plantación ideal es justo antes de la temporada de lluvias para así favorecer el inicio del desarrollo de la planta. Después de la nueva plantación los agaves tardan entre 7 y 8 años en alcanzar su estado de madurez e iniciar, en algunos casos, el proceso de floración con el desarrollo de un quiote que puede alcanzar una altura de 6 a 7 metros. La cosecha de los agaves se lleva a cabo antes del proceso de floración para obtener plantas con altas concentraciones de azúcares. Para la cosecha primero se cortan todas las hojas y después se corta la planta que tiene un aspecto de piña, la cual pesa entre 20 y 90 kg. La composición de los agaves cosechados cambia en función de la temporada, en promedio (base húmeda) los agaves contienen 27% (p/p) de azúcares reductores. Estos azúcares pertenecen a la familia de los fructanos y presentan la interesante característica de ser altamente ramificados.

» *Cocimiento y molienda*

Antes de ser fermentados los agaves tienen que pasar por dos procesos importantes para poder obtener los azúcares fermentables. Primero se lleva a cabo el proceso de cocimiento, el cual tiene tres objetivos, el primero es realizar la hidrólisis de los fructanos para generar azúcares simples, fructosa y glucosa en una proporción aproximada de 90/10; el segundo es ablandar el agave, lo que facilitará la etapa siguiente, la molienda; finalmente, el proceso de cocción propicia la generación de compuestos importantes para el perfil aromático del destilado final.

En las fábricas antiguas la cocción se realizaba en hornos de piso. Actualmente en la industria la cocción se lleva a cabo en hornos de mampostería o en autoclaves. La cocción en horno es lenta, tarda varios días. En general durante la primera fase de la cocción se inyecta vapor a los hornos para alcanzar una temperatura de aproximadamente 100°C. Después se detiene la inyección de vapor y se deja el horno todavía dos días más antes de abrirlo, permitiendo que los agaves se enfríen antes de pasar al proceso de molienda. Las fábricas artesanales han conservado este proceso de cocción; sin embargo, muchas han cambiado los hornos de mampostería por autoclaves que permiten un cocimiento más eficiente y homogéneo. En este caso resulta más fácil controlar la presión y la temperatura de cocción, y el tiempo de cocimiento es mucho más corto, alrededor de un día. En los dos casos se recolectan mieles de cocción, las cuales contienen azúcares no hidrolizados lo que representa una pérdida en cuanto a cantidad de azúcares.

Cabe mencionar que en los últimos 15 años la mayoría de las grandes empresas con procesos muy industrializados están utilizando difusores, los cuales realizan una

Piñas dispuestas a ser cocidas, en la destilería"La Alteña". Arandas, Jalisco.

extracción de los fructanos en agave crudo y una hidrólisis posterior en líquido. Con este equipo ya no se realiza la cocción tradicional, lo que genera algunos problemas en la parte aromática y en la composición del mosto; sin embargo, desde el punto de vista del costo de producción resulta muy interesante. La gran ventaja es que se alcanza a extraer casi 100% de los azúcares.

» *Fermentación*

La fermentación, como en todas las bebidas alcohólicas, es una etapa clave en la elaboración del tequila. Durante este paso, los azúcares del agave (principalmente fructosa) se metabolizan a etanol, dióxido de carbono, y otros compuestos activos de sabor por la acción de diferentes microorganismos, en particular levaduras.

En la formulación del mosto además de los azúcares la norma del tequila permite una complementación con nutrientes adicionales, en particular una fuente de nitrógeno. Los compuestos adicionados pueden ser urea (no muy aconsejable por ser precursor del carbamato de etilo), sulfato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de magnesio, y en algunos casos nutrientes complejos. El intervalo de concentración de azúcar inicial es entre 4 a 10% p/v en el caso del tequila 100% agave, y entre 8% a 16% p/v en tequila dependiendo de la destilería. El pH natural del mosto oscila alrededor de 4.5, así que no se necesita ningún ajuste.

En cuanto al desarrollo de la fermentación la industria se divide en dos grandes grupos, los primeros siguen utilizando fermentaciones ancestrales espontáneas (la gran mayoría de las pequeñas destilerías), y los segundos, principalmente las grandes empresas industrializadas, emplean levaduras específicas seleccionadas. En el caso de las fermentaciones espontáneas existe un solo estudio exhaustivo de los microorganismos presentes en la fermentación, así como en toda la destilería y la materia prima (Lachance, 1995).

Actualmente varias de las destilerías inoculan sus fermentaciones con levaduras seleccionadas. Estas levaduras son de diferentes orígenes, levaduras de panificación (en el peor de los casos), levaduras vínicas o para otras bebidas alcohólicas, o bien levaduras para la industria alcoholera. Definitivamente la mejor opción para las destilerías es aislar su propia microbiota y utilizarla de manera controlada para el desarrollo de sus fermentaciones. Cabe mencionar que ninguna levadura originaria del proceso de elaboración del tequila está disponible en el mercado como levadura seca activa.

» *Destilación*

La destilación es la última etapa para obtener el tequila blanco. El proceso clásico consiste en una doble destilación en alambiques de cobre o de acero (Cedeño-Cruz, 1995). En la primera etapa de destilación tres productos son colectados, la primera fracción ligera llamada *"cabezas"* es reciclada en el mosto de fermentación, la segunda fracción constituye el producto que se va volver a destilar llamado *"ordinario"*, y finalmente se colectan las *"colas"* las cuales se desechan. Actualmente algunas de las destiladoras industrializadas utilizan una destilación continua en columnas. La ventaja es la rapidez de destilación; sin embargo, el tequila obtenido es menos aromático que el tequila producido en alambiques, así que algunas empresas realizan mezclas entre tequilas obtenidos de alambiques y columnas.

» *Reposo*

El reposo o el añejamiento del tequila tiene como objetivo permitir una lenta transformación que otorga al tequila características aromáticas específicas, por medio de su permanencia (diferentes tiempos definidos por la NOM) en barricas o contenedores de madera.

3.15.4 NIVEL DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN

En cuanto a los volúmenes de producción, en la Figura 3.6 se presenta la evolución de la producción del tequila 100% agave, del tequila, así como del total de 1995 a 2014. Se observa una serie de fluctuaciones a lo largo de los años relacionadas sobre todo con la disponibilidad de materia prima.

Es significativo mencionar que un alto porcentaje de la producción se exporta al extranjero, particularmente a Estados Unidos de América. En 2014 un poco más de 70% de la producción fue de exportación. Es importante mencionar que gran parte del tequila exportado es a granel.

3.15.5 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

De todas las bebidas destiladas de agave el tequila es la bebida de la cual se han generado más conocimientos, tanto sobre la materia prima como del proceso de elaboración. Una gran parte de este conocimiento está plasmado en el libro Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y Perspectivas (Gschaedler-Mathis *et al.*, 2015). Sin embargo, varios grupos de investigación siguen trabajando en el tema, en particular sobre la materia prima, los procesos de fermentación y destilación, así como en la caracterización del producto final.

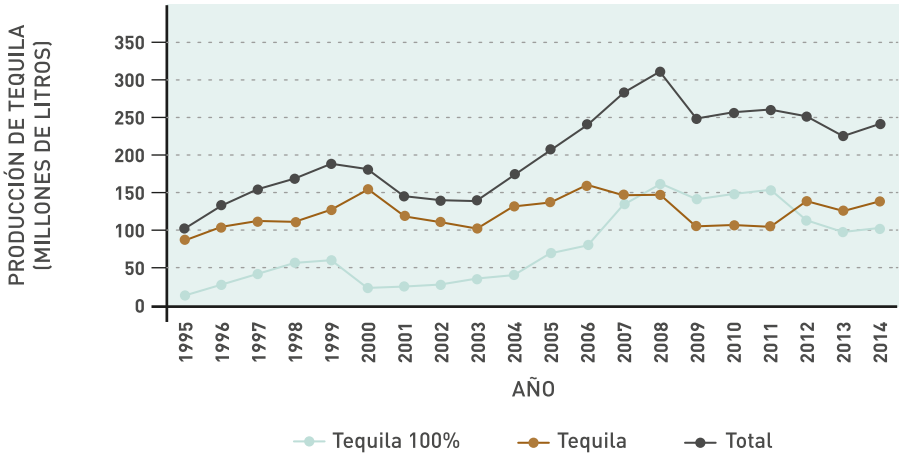


FIGURA 3.6 Evolución de la producción de tequila desde 1995 (millones de litros a 40% Alc/Vol). Fuente: Consejo Regulador del Tequila.

3.15.6 ANÁLISIS DE LA PROBLEMÁTICA ESPECÍFICA DEL TEQUILA

Una problemática específica de esta bebida es el asunto de las adulteraciones, la cual no se ha resuelto. Otro punto importante que tiene que atender la industria es la sustentabilidad, ya que sus procesos de tratamientos de residuos todavía no son eficientes. Existe una importante área de oportunidad relacionada con tener procesos eficientes, en particular desde el punto de vista energético. A este tema se añade la disponibilidad y suministro de materia prima.

3.15.7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los procesos de producción del tequila son los más industrializados de las bebidas destiladas de agave. Sin embargo, existen todavía pequeños productores que siguen empleando el método artesanal. Uno de los retos de la industria es la convivencia de ambos tipos de producciones, ya que con el paso del tiempo los pequeños productores tienen cada vez más dificultades para comercializar sus productos. Estos procesos artesanales pueden todavía ser eficientes, reducir pérdidas y estandarizar los productos finales.

En tanto a la investigación falta todavía entender una serie de fenómenos en las operaciones unitarias del proceso, en particular durante las etapas de fermentación y destilación.

Es necesario atender la disponibilidad de materia prima, la cual fluctúa en función de los años e impacta de manera considerable, tanto en los niveles de producción, en los costos, y en todos los puntos mencionados para la elaboración del tequila y de los diferentes destilados, en general en nuestro país.

3.16 REFERENCIAS

Aguilar-Juárez, B., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., Granados-Sánchez, D. & Martínez-Cerero, B. (2014). *El estado actual de Agave salmiana y A. mapisaga del Valle de México*. Revista Mexicana de Agroecosistemas, 1 (2), 106-120. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.itvalleoaxaca.edu.mx/posgradoitvo/RevistaPosgrado/docs/RMAE%20vol%201_2_2014/RMAE-2014-11%20Agave.pdf.

Aguirre-Rivera, J. R., Charcas-Salazar, H. & Flores-Flores, J. L. (2001). *El maguey mezcalero potosino*. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí- Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, San Luis Potosí, México.

Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, A., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M, Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., Ávila-Reyes, J. A. & Muñiz-Martínez, R. (2009). *Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of Agave durangensis Gentry (Agavaceae).* American Journal of Applied Science, 6 (6), 1076-1085.

Almaraz-Abarca, N, Delgado-Alvarado, A., Torres-Morán M, Herrera-Corral J., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez S. & Uribe-Soto, A. (2013). *Genetic variability in natural populations of Agave durangensis (Agavaceae) revealed by morphological and molecular traits*. Southwestern Naturalist, 58 (3), 314-324.

Álvarez, J. R. (Ed.). (1987). *Pulque. Enciclopedia de México* (Volumen XI, pp. 6722-6731). Secretaría de Educación Pública, México.

Álvarez-Ainza, M., García-Galaz, A., González-Rios, H., Prado-Jaramillo, N. & Acedo-Félix, E. (2015). *Sensory analysis and minor volatil compounds of distilled from Agave angustifolia Haw (Bacanora).* Biotecnia, 17 (3), 22-29.

Álvarez-Ainza, M., González-Ríos, H., González-León, A., Ojeda-Contreras, A. J., Valenzuela-Quintanar, A. & Acedo-Félix, E. (2013). *Quantification of major volatile compounds in artisanal agave distilled: Bacanora.* American Journal of Analytical Chemistry (4) 683-688.

Álvarez-Ainza, M., Zamora-Quiñonez, K. & Acedo-Félix, E. (2009). *Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora.* Revista Latinoamericana de Microbiología, 51 (1-2), 58-63. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2009/mi091_2h.pdf.

Álvarez-Ainza, M. L., Zamora-Quiñonez, K., Moreno-Ibarra, G. M. & Acedo-Félix, E. (2015, marzo). *Genomic diversity of Saccharomyces cerevisiae yeast associated with alcoholic fermentation of Bacanora produced by artisanal methods.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 175 (5), 2668-2676.

Alves-de Azeredo, G., Montenegro-Stamford, T., Leite-de Souza, E., Fonseca Veras, F., Rodrigues-de Almeida, E. & De Araujo, J. M. (2010). *In vivo assessment of possible probiotic properties of Zymomonas mobilis in a Wistar rat model.* Electronic Journal of Biotechnology, 13 (2), 1-7.

Armenta, A. (2003). *Hongos filamentosos y micorrízicos asociados con Agave angustifolia Haw.* Tesis de Maestría (no publicada). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora.

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J. & Peña-Ortega, M. G. (2008). *Propagación in vitro del "maguey bruto" (Agave inaequidens Koch), una especie amenazada de interés económico.* Revista Chapingo Serie Horticultura, 14 (3), 263-269. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006

Ávila-Valenzuela, F. (2013). *Efecto de la inoculación secuencial sobre la fermentación de mosto de agave y producción de mezcal.* Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Durango, México.

Backstrand, J. R., Allen, L. H., Martínez, E. & Pelto, G. (2001). *Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: Relationship to infant growth and development.* Public Health Nutrition 4 (4), 883-891.

Backstrand, J. R., Allen, L. H., Black, A. K., De Mata, M. & Pelto, G. H. (2002). *Diet and iron status of non-pregnant women in rural central Mexico.* American Journal of Clinical Nutrition, 76 (1), 156-164.

Banco Nacional de Comercio Exterior-Bancomext. (2007). Disponible en http://www.bancomext.com

Barraza-Soto, S., Domínguez-Calleros, P. A., Montiel-Antuna, E., Návar-Chaidez, J. J. & Díaz-Vásquez, M. A. (2014). *Producción de mezcal en el Municipio de Durango, México.* Ra Ximhai, 10 (6), 65-74.

Barriada-Bernal, G., Almaraz-Abarca, N., Gallardo-Velázquez, T., Torres-Morán, M., Herrera-Arrieta, Y., González-Elizondo, S. & Delgado-Alvarado, A. (2013, noviembre). *Seed vigor variation of Agave durangensis Gentry (Agavaceae).* American Journal Plant Science, 4 (11), 2227-2239.

Bartolache, J. I. (1979). *Uso y abuso del pulque para curar enfermedades.* El Mercurio Volante (1772-1773). Biblioteca del Estudiante Universitario, 101. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Bennet, L. A., Campillo, C., Chandrashekar, C. R. & Gureje, O. (1998). *Alcoholic beverage consumption in India, Mexico and Nigeria.* Alcohol Health Research World, 22 (4), 243-252.

Berumen, M. E. (2009). *La actividad productiva maguey-mezcal.* En: www.eumed.net/libros-gratis/2009a/492/

Blomberg, L. (2000). *Tequila, mezcal y pulque, lo auténtico mexicano.* Ed. Diana, México.

Bruman, H. J. (2000). *Alcohol in Ancient Mexico.* Salt Lake City, UT. The University of Utah Press, EUA.

Cabrera, L. (1974). *Diccionario de aztequismos.* Ediciones Oasis, México.

Campos, M. R., Mora, E. R. & Hernández, S. H. (2001). *Obtención de un probiótico de bifidobacterias utilizando como base aguamiel.* Memorias del II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz, México.

Carrillo-Trueba, L. A. (2007). *Los destilados de agave en México y su Denominación de Origen.* Ciencias 87, 40-49.

Castro, A. & Guerrero, B. (2014). *Tratamiento de aguamiel mediante ultrafiltración y luz ultravioleta para aumentar su vida de anaquel.* Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.

Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H. & Yáñez Fernández, J. (2015). *Probiotic properties of Leuconostoc mesenteroides isolated from aguamiel of Agave salmiana.* Probiotics Antimicrobial Proteins 7, 107–117

Cedeño-Cruz, M. (1995). *Tequila production*. Critical Review Biotechnology, 15 (1), 1-11.

Cedeño-Cruz, M. & Álvarez-Jacobs, J. (2003). *Tequila production from agave: historical influences and contemporary process.* En K. A. Jacques, T. P. Lyons & D. R. Kelsall (Eds.), *The alcohol textbook, 4th edition* (pp. 223-245). Nottingham University Press, Nottingham, Inglaterra.

Chávez, A., Martínez, H., Guarneros, N., Allen, L. H. & Pelto, G. H. (1998). *Nutrition and psychomotor development during the first six months of life.* Salud Pública de México, 40 (2), 111-118.

Chellapandian, M., Larios, C., Sánchez-González, M. & López-Munguía, A. (1998). *Production and properties of a dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides IBT-PQ isolated from pulque, a traditional Aztec alcoholic beverage.* Journal Industrial Microbiology and Biotechnology, 21 (1), 51-56.

Clavijero, F. J. (1978). *Historia antigua de México.* Editorial Valle de México, México.

Colunga-García Marín, P., Eguiarte, L., Larqué S. & Zizumbo-Villarreal, D. (2007). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves.* Centro de Investigación Científica de Yucatán, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto Nacional de Ecología, México.

Colunga-García Marín, P. & Zizumbo-Villareal, D. (2004). *Origen, domesticación y diversidad del tequila (Agave tequilana Weber) y otros mezcales del occidente de México.* En P. Colunga-García M. (Ed.), *Los agaves de importancia económica en México.* México: Centro de Investigación Científica de Yucatán, Academia Mexicana de Ciencias, México.

Colunga-García Marín, P. & Zizumbo-Villarreal, D. (2007). *Tequila and other agave spirits from west-central México: Current germplasm diversity, conservation and origin.* Biodiversity and Conservation, 16 (6), 1653-1667.

Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal-COMERCAN (2012). *Informe Anual Consejo Directivo, abril 2009-abril 2012.* Oaxaca, México.

Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal-COMERCAM (2008). *Gaceta Parlamentaria.* Disponible en http://www.COMERCAM.org

Consejo Regulador del Mezcal-CRM (2015). *Informe 2015.* Recuperado el 2 de mayo de 2016 http://www.crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDADES/INFORME2014.pdf

Cook, J. D., Reddy, M. B. & Hurrel, R. F. (1995). *The effect of red and white wines on non-heme-iron absorption in humans.* The American Journal of Clinical Nutrition, 61 (4), 800-804.

Corcuera-de Mancera, S. (1977). *El fraile, el indio y el pulque. Evangelización y embriaguez en la Nueva España (1523-1548).* Fondo de Cultura Económica, México.

Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortes, O., Cabrera-Castro, R. & Evershed, R. P. (2014). *Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica*. Proceedings. National Academy. Sciences. U.S.A.111, 14223–14228

Corona-Pérez, S. A. (2001). *Las bebidas prohibidas en la Nueva Vizcaya.* Mensajero del Archivo Histórico de la Universidad Iberoamericana Laguna, 31, 2-6.

Cravioto, R. O., Massieu, H. G., Guzmán, J. & Calvo-de la Torre, J. (1951). *Composición de alimentos mexicanos.* Ciencia, XI, 129-156.

De Balmis, F. X. (1794). *Demostración de las eficaces virtudes nuevamente descubiertas en las raíces de dos plantas de Nueva España, especie de agave y de begonia.* Imprenta de la viuda de Joaquín Ibarra, Madrid, España.

De Benavente, T. (1963). *Historia de los indios de Nueva España.* Editorial Nacional, México.

De Sahagún, B. (2003). *Historia general de las cosas de la Nueva España.* (Volumen I). Dastin SL., Madrid, España.

De la Cruz, M. & Badiano, J. (1964). *Libellus de medicinalibus indorum herbis.* Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M. I., Ordoñez-Acevedo, L. G., Flores-Flores, J. L. & Barba-de la Rosa, A. P. (2008). *Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry.* Food Technology and Biotechnology, 46 (4), 448-455.

De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba-de la Rosa, A. P., Escalante-Minakata, P. & López, M. (2006). *Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave salmiana.* Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54 (4), 1337-1341.

Diario Oficial de la Federación-DOF. (2000). Director General del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. *Extracto de la solicitud de declaración de protección de la Denominación de Origen bacanora. México, D.F.* Recuperado el 22 de abril de 2005 de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=2055070&fecha=31/12/1969

Diario Oficial de la Federación-DOF. (2005). *Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCFI-2004. Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado.* 1° sección, pp. 37-49.

Diario Oficial de la Federación-DOF. (2017). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.* México. Consultado el 15 de marzo 2017 en http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017

Diguet, L. (1928). *Les cactacées utiles du Mexique.* Archives D´Histoire Naturelle. Société Nationale D´ Acclimatation de France, Paris, Francia.

Durán-García, H. M., González-Galván, E. J. & Matadamas-Ortíz, P. (2007). *Mechanization process in the production of mezcal.* Journal of Food Agriculture and Environment, 5 (3-4), 32-35.

Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolivar, F. & Gosset, G. (2004). *Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis.* FEMS Microbiology Letters, 235 (2), 273-279.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M., López-Munguía, A., Gosset, G. & Bolivar, F. (2008). *Analysis of the bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach.* International Journal of Food Microbiology, 142 (2), 126-134.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel, G., Matus-Acuña, V, Moreno-Terraza, R, López-Munguía A. & Lappe-Oliveras, P. (2012). *Pulque fermentation.* En Y. H. Hui & E. Özgül-Evranuz (Eds.), *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology* (pp 691-706). CRC Press Inc. Boca Ratón, FL, EUA.

Escalante A. , López Soto D. R., Velázquez Gutiérrez, J .E., Giles-Gómez, M., Bolívar F. & López-Munguía A. (2016). *Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects.* Frontiers in Microbiology 7, 1026.

Flores-Morales, A., Mora-Escobedo, R. & Romero-Aguilar L. (2008). *Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (Agave spp).* Memorias *in extenso* del X Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Gómez Palacio, Durango, México.

Fournier-García, P. & Mondragón-Barrios, L. (2012). *Las bebidas mexicanas pulque, mezcal y tesgüino.* Arqueología Mexicana, 114 (2), 3-59.

Gallardo-Valdez, J., Gshaedler-Mathis, A., Chazaro-Basañes, M. J., Rodríguez Domínguez, J. M., Tapia-Campos, E., Villanueva-Rodríguez, S., Salado-Ponce, J. H., Villegas-García, E., Medina-Niño, R., Aguirre-Ochoa, M., Vallejo-Pedraza, M. (2008). *La producción de mezcal en el Estado de Michoacán.* Gobierno del Estado de Michoacán, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México.

García, S. E., Valentín, D., Escalona, H. B., Herrera, E. & Villanueva, S. J. (2013). *Classifying different mezcals spirits through sensory descriptors and artificial neural networks.* 10th Pangborn Sensory Science Symposium, Río de Janeiro, Brasil.

García, S. E., Valentín, D., Escalona, H. B., Herrera, E. & Villanueva, S. J. (2014). *Comparison of artificial neural network and statistical tools for characterization of consumer segments.* 11th Pangborn Sensory Science Symposium, Gotemburgo, Suecia.

García-Barrón, S. E. (2012). *Efecto de la región de procedencia del agave y las condiciones de fermentación sobre el perfil aromático de mezcal.* Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, México.

García-Garibay, M. & López-Munguía, A. (1993). *Bebidas alcohólicas no destiladas.* En M. García-Garibay, R. Quintero-Ramírez, & A. López-Munguía (Eds.), *Biotecnología alimentaria* (pp. 263-311). Limusa, México.

García-Mendoza, A. (1995). *El maguey una planta maravillosa.* En Cofradía en apoyo de la Mayora Mexicana (Ed.), *En torno al pulque y al maguey.* Grupo Editorial Siquisiri, México.

García-Mendoza, A. (1998). *Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del Jardín Botánico.* Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Biología, Jardín Botánico, México.

García-Salazar, A. & Macías-Rodríguez, F. J. (2010). *Producción de maguey y mezcal: estrategias de desarrollo rural en Teúl de González Ortega, Zacatecas.* Revista de Geografía Agrícola, 45, 7-17.

Giles-Gómez, M., Sandoval García, J. G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F. & Escalante, A. (2016). I*n vitro and in vivo probiotic assessment of Leuconostoc mesenteroides P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage.* SpringerPlus 5, 708-718

Gobierno del Estado de Hidalgo & Museo Nacional de Culturas Populares. (1988). *El maguey: árbol de las maravillas.* Instituto Nacional Indigenista, Secretaría de Educación Pública, Dirección General de Culturas Populares, México.

Godínez-Hernández, C. I. (2012). *Caracterización y eficiencia de la fermentación en la elaboración del mezcal potosino.* Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. (2003). *Más allá del pulque y el tepache.* Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Gómez-Aldapa, C. A., Díaz-Cruz, C. A., Villarruel-López, A., Del Refugio-Torres Vitela, M. R., Añorve-Morga, J., Rangel-Vargas, E., Cerna-Cortés, J. F., Vigueras-Ramírez, J. G. & Castro-Rosas, J. (2011). *Behavior of Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Listeria monocystogenes, Shigella flexneri and Shigella sonnei during production of pulque, a traditional Mexican beverage.* Journal of Food Production, 74 (4), 580-587.

Gómez-Aldapa, C. A., Díaz-Cruz, C. A., Villarruel-López, A., Del Refugio- Torres Vitela, M. R., Rangel-Vargas, E. & Castro-Rosas, J. (2012). *Acid and alcohol tolerance of Escherichia coli O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage.* International Journal of Food Microbiology, 154 (1-2), 79-84.

Gonçalves-de Lima, O. (1978). *El maguey y el pulque en los códices mexicanos.* Fondo de Cultura Económica, México.

Gonçalves-de Lima, O. (1990). *Pulque, balché y pajaguarú en la etnobiología de las bebidas y de los alimentos fermentados.* Fondo de Cultura Económica, México.

González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P. & Rivera-Espinoza, Y. (2015). *Isolation, identification and partial characterization of a Lactobacillus casei strain with bile salt hydrolase activity from pulque.* Probiotics Antimicrobial Proteins 7, 242–248.

Gschaedler-Mathis, A. C., Rodríguez-Garay, B., Prado-Ramírez, R., Flores-Montaño, J. L. (Eds.). (2015). *Ciencia y tecnología del tequila, avances y perspectivas.* Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco, México.

Guía México. *Comiteco Balun Canan.* Recuperado de http://guiamexico.com.mx/empresas/comiteco-balun-canan-s-de-r-l-de-c-v.html. Fecha de consulta: 08 de noviembre de 2015.

Illsey-Granich, C., Giovannucci, D. & Bautista, C. (2009). *La dinámica territorial de la zona mezcalera de Oaxaca entre la cultura y el comercio.* Grupo de Estudios Ambientales, México.

Illsey-Granich, C., Gómez-Alarcón, T., Rivera-Méndez, G., Morales-Moreno, M. P., García-Bazán, J., Ojeda-Sotelo, A., Calzada-Rendón, M., Mancilla-Nava S. (2005). *Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Proyecto Núm. V028. Grupo de Estudios Ambientales A. C., Informe final.* Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI. (2013). *Recuperado el 13 de noviembre de 2015 de http://www/INEGI.org.mx/sistemas/saic/?evento=2004*

Jacques-Hernández, C., Herrera, P. O. & Ramírez-de León, J. A. (2004). *El maguey mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas.* IV Simposium Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Academia Mexicana de Ciencias Centro de Investigación Científica de Yucatán, Consejo Nacional del Agave/Universidad Nacional Autónoma de México, Tequila Herradura, Mérida, Yucatán, Guerrero.

Kershenovich, D. (1999). *Endotoxinas y daño hepático.* En Fundación de Investigaciones Sociales (Ed.), *El pulque, la cultura y la salud.* Cuadernos de Investigación FISAC 1 (2), 30-38. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.alcoholinformate.org.mx/seminarios/Cuaderno2.pdf

Kirchmayr, M. R., Arellano-Plaza, M., Estarrón-Espinosa, M., Gallardo-Valdez, J., Gschaedler-Mathis, A. G., López-Ramírez, J. E., Navarro-Hurtado, A., Prado-Ramírez, R. & Ramírez-Romo, E. (2014). *Manual para la estandarización de los procesos de producción de mezcal guerrerense*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco. México.

Kolendo, J. (2002). *The agave: A plant and its story.* Articles. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de http://www.desert-tropicals.com/Articles/Agave/

Lachance, M. A. (1995). *Yeast communities in a natural tequila fermentation.* Antonie van Leeuwenhoek, 68 (2), 151-160.

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizon-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García Mendoza, A. & Gschaedler-Mathis, A. (2008). *Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic non-distilled and distilled Agave beverages.* FEMS Yeast Research, 8 (7), 1037-1052.

Lappe-Oliveras, P., Aguilar, A., Iglesias, P., Vedrenne, F., Blackaller, C., De La Rosa, M. & Moreno-Terrazas, R. (2011). *Microbial diversity in lechuguilla, a refreshing Mexican agave fermented beverage.* 29th International Specialised Symposium on Yeast, Guadalajara, Jalisco, México.

Lappe-Oliveras, P. & Herrera-Suárez, T. (2013). *Evolución en los estudios de la diversidad microbiana de las bebidas y alimentos fermentados indígenas de México, con especial referencia al pulque.* En A. Moreno Fuentes & R. Garibay Orijel (Eds.), *La etnomicología en México. Estado del arte* (pp. 33-58). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Red de Etnoecología y Patrimonio Bicultural, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Universidad Autónoma de México-Instituto de Biología, Sociedad Mexicana de Micología, Asociación Etnobiológica Mexicana, Grupo Interdisciplinario para el Desarrollo de la Etnomicología en México, Sociedad Latinomaericana de Etnobiología, México.

Lemus, C. B., Kaiser, A. & Montville, T. J. (1991). *Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat.* Applied and Environmental Microbiology, 57 (6), 1683-1688.

Lemus, F. E. (2006). *Los enemas prehispánicos como instrumentos para aplicar probióticos.* Temas de Ciencia y Tecnología, 10 (29), 17-26. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.utm.mx/temas/temas-docs/ensayo3t29.pdf

Lindner, P. (1928). *Bericht des Westpreussischen.* Botanisch-Zoologischen Vereins 5, 253-255.

López-Nava, G., Martínez-Flores, J. L., Cavazos-Arroyo, J. & Mayett-Moreno, Y. (2014). *La cadena de suministro del mezcal del estado de Zacatecas. Situación actual y perspectivas de desarrollo.* Contaduría y Administración, 59 (2), 227-252. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.scielo.org.mx/pdf/cya/v59n2/v59n2a10.pdf

Loyola-Montemayor, E. (1956). *La industria del pulque.* Departamento de Investigaciones Industriales, Banco de México, México.

Luevano-Martínez, M. (2010). *Efecto de la concentración de nitrógeno sobre la producción de etanol en la elaboración de bacanora con distintas cepas y consorcios de levaduras.* Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Sonora, México.

MacFarlane, G. T., Steed, H. & MacFarlane, S. (2008). *Bacterial metabolism and health related effects of galactooligosaccharides and other prebiotics.* Journal of Applied Microbiology, 104 (2), 305-344.

Maldonado, C. M., Bayona, M. A. & Poutou, R. A. (2001). *Efecto antagónico de Zymomonas mobilis spp. frente a Salmonella sp. y Proteus mirabilis.* Universitas Scientiarum, 6 (2), 1-9.

Marina, A. U. E. (2015). *Proyecto de norma oficial mexicana PROY-NOM-199-SCFI-2015 "Bebidas alcohólicas–denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba".* Secretaría de Economía, México.

Martín del Campo, R. (1938). E*l pulque en el México precortesiano.* Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México 9, 5-23.

Massieu, H., Guzmán, G. J., Cravioto, R. O. & Calvo, J. (1949). *Determination of some essential amino acids in several uncoocked Mexican foodstuffs.* Journal of Nutrition, 38 (3), 293-304.

Massieu, H., Cravioto, R. O., Guzmán, G. J. & Olivera, B. H. (1959). *Contribución adicional al estudio de la composición de los alimentos mexicanos.* Ciencia- Revista Hispano-americana de Ciencias Puras y Aplicadas, XIX (4-5), 53-66. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://cedros.residencia.csic.es/imagenes/Portal/ciencia/1959_19_04-05-z2.pdf

Medina-Mora, M. E. (1999). *El pulque, la cultura y la salud*. En J. M. Muriá (Ed.), *Beber de tierra generosa. Historia de las bebidas alcohólicas en México.* Fundación de Investigaciones Sociales, México.

Monterrubio, A. L. (2007). *Las haciendas pulqueras de México.* Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Moreno, L. (2011). *Aumentan 54% exportaciones de mezcal.* Zacatecasonline.com.mx. http://zacatecasonline.com.mx/noticias/local/13239-aumentan-exportaciones-mezcal

Moreno, S. (1998). *Agave angustifolia. El bacanora, desde su origen hasta nuestros días. Una bebida sonorense con calidad internacional.* Entorno (2).

Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A. & Olvera-Carranza, C. (2006). *Identification and functional charcaterization of levS, a gene coding for a levansucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512 F.* Gene, 376 (1), 59-67.

Morales de León, J., Bourges, H. & Camacho, M. E. (2005). *Aminoacid composition of some Mexican foods.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 55, 172–186.

Narro-Robles, J., Gutiérrez-Ávila, H., López-Cervantes, M., Borges, G. & Rosovsky, H. (1992). *La mortalidad por cirrosis hepática en México II. Exceso de mortalidad y consumo de pulque.* Revista de Salud Pública de México, 34 (4), 388-405.

Narváez-Suárez, A. U. & Jiménez-Velázquez, M. A. (2014). *Política pública para apoyar el aprovechamiento integral y sustentable del maguey pulquero: una alternativa para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano.* 2º Congreso Internacional de la Asociación Mexicana de Ciencias Políticas. Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, *"Bebidas Alcohólicas-mezcal-Especificaciones"*.

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, *"Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones"*.

Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, *"Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial"*.

Núñez, L. (2003a). *Estrategias para el desarrollo de la industria de bacanora.* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México.

Núñez, L. (2003b). *La producción de mezcal bacanora.* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México.

Olivas-Gallegos, U. E., Valdez-Lazalde, J. R., Aldrete, A., González-Guillén, M. J. & Vera-Castillo, G. (2007). *Áreas con aptitud para establecer plantaciones de maguey cenizo: definición mediante análisis multicriterio y sig.* Revista Fitotecnia Mexicana, 30 (4), 411-419.

Olvera, C., Centeno-Leija, S. & López-Munguía, A. (2007). *Structural and functional features of fructansucrases present in Leuconostoc mesenteroides ATCC 8293.* Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 92 (1), 11-20.

Ortiz-Basurto R. I., Pourcelly, G., Doco, C. T., Williams, P., Dornier, M. & Belleville, M. P. (2008). *Analyses of the main components of the aguamiel produced by the maguey pulquero (Agave mapisaga) throughout the harvest period.* Journal Agricultural and Food Chemistry, 56 (10), 3682-3687.

Páez-Lerma, J. B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Barrio, E. & Soto-Cruz, N. O. (2013). *Yeasts isolated from the alcoholic fermentation of Agave duranguensis during mezcal production.* Food Biotechnology, 27 (4), 342-356.

Parsons, J. R. & Darling, J. A. (2000). *Maguey (Agave spp.) utilization in Mesoamerican civilization: a case for Precolumbian "pastoralism".* Boletín Sociedad Botánica de México, 66, 81–91

Peana, A. T., Moretti, M. D., Manconi, V., Desole, G. & Pippia, D. (1997). *Anti inflamatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of Agave americana.* Planta Médica, 63 (3), 199-204.

Pinal-Zuazo, L. (1998). *Asistencia técnica a cinco empresas del estado de Zacatecas.* Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Bancomext, México.

Plan Rector Sistema Nacional Maguey Mezcal. (2005). Recuperado el 2 de mayo de 2016 de http://www.sientemezcal.com/pdf/PlanRector.pdf

Poblet, M. (1995). *El pulque, una bebida que se extingue.* En A. Delgado (Ed.), *En torno al pulque y al maguey.* Grupo Editorial Siquisiri, México.

Programa Regional De Desarrollo. Región XV Meseta Comiteca Tojolabal. Recuperado de: http://www.haciendachiapas.gob.mx/planeacion/Informacion/DesarrolloRegional/prog-regionales/ . Fecha de consulta: 08 de noviembre de 2015.

Ramírez, J. F., Sánchez-Marroquín, A., Álvarez, M. M. & Valyasebi, R. (2004). *Industrialization of Mexican pulque.* En K. Steinkraus (Ed.), *Industrialization of indigenous fermented foods* (pp. 547-586). Marcel Dekker Inc., Nueva York, EUA.

Ramírez-Castañeda, E. (1994). *Bebidas nacionales.* Guía México Desconocido, 18. Editorial Jilguero, México.

Ramírez-Rancaño, M. (2000). *Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera.* Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Investigaciones Sociales, Plaza & Valdés, México.

Ramírez Rodríguez, R. (2004). *El Maguey y el Pulque: Memoria y Tradición Convertidas en Historia, 1884-1993.* Tesis de Licenciatura en Historia. Facultad de Filosofía y Letras, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Región XV Meseta Comiteca Tojobal. Recuperado de: http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/wpcontent/uploads/Secciones/InfoPorNivel/InfoRegional/Contexto/. Fecha de consulta: 08 de noviembre de 2015.

Reyes-Naya, L., Garduño-Siciliano, L., Santos, E., Hernández-Sánchez, H. A., Arauz, J., Muriel, P., *et al.,* (2016). *Use of bile acids as a selection strategy for lactobacillus strains with probiotic potential.* J. Food Nutritional Disorders 5, 1-11.

Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, A., López-Báez, W., López-Luna, A. (2012 a). *Identificación taxonómica de las especies de Agave utilizadas para la elaboración del licor comiteco en Chiapas.* Folleto Técnico, 14. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Centro Chiapas, Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas México.

Reynoso-Santos, R., López-Luna, A., López-Báez, W. & Ruis-Corral, J. A. (2012 b). *Áreas potenciales para el cultivo de agave (Agave americana L.) en la meseta Comiteca, Chiapas.* Folleto Técnico, 13. Secretaría de agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Centro Chiapas, Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas México.

Río de la Loza, L. (1864). *Apuntes sobre algunos productos de maguey.* Boletín Sociedad Mexicana Geografía Estadística México (X), 531-539.

Rodríguez-Córdova, R. J. (2015). *Perfil de compuestos volátiles en bacanoras artesanal y comercial.* Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Sonora, México.

Rosas-Medina, I., Colmenero-Robles, A., Naranjo-Jiménez, N. & Rodríguez-García, H. (2013). *El mezcal de Durango, México.* Vidsupra, 5 (2), 113-117. Recuperado el 23 de octubre de 2016 de http://www.ciidirdurango.ipn.mx/REVISTA_VIDSUPRA/Documents/REVISTAS%20IMPRESAS/VSV5N2.pdf

Salazar-Solano, V. & Mungaray-Lagarda, A. (2009). *La industria informal del mezcal bacanora.* Estudios Sociales. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. 17 (33) 165-198.

Salvatierra-García, A. (2003). *El mezcal y su importancia para el desarrollo económico del estado de Oaxaca. El sector exportador: retos y oportunidades en el mercado de la Unión Europea.* Tesis de Licenciatura. Universidad de las Américas, Puebla, México.

Sánchez-López, A. (2005). *Oaxaca tierra de maguey y mezcal. Reporte de proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "Plan de desarrollo de la agroindustria del Agave en Oaxaca".* Centro de Graduados del Instituto Tecnológico de Oaxaca, Comercializadora Oaxaqueña del Centro, Oaxaca, México.

Sánchez-Marroquín, A. (1949). *Nuevos datos acerca de la microbiología del pulque.* Memorias Revista de la Sociedad Científica Antonio Alzate, 56 (4), 505-517.

Sánchez-Marroquín, A. (1967). *Estudio sobre la microbiología del pulque, XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida.* Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología 9, 87-90.

Sánchez-Marroquín, A. (1970). *Investigaciones realizadas en la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, tendientes a la industrialización del agave, XIV.* Journal of the Mexican Chemical Society 4, 184-188.

Sánchez-Marroquín, A. (1977). *Mexican pulque, a fermented drink from agave juice.* Proceedings of the Symposium on Indigenous Fermented Foods. Bangkok, Tailandia.

Sánchez-Marroquín, A. (1979). *Los agaves de México en la industria alimentaria.* Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo, México.

Sánchez-Marroquín, A. & Hope, P. H. (1953). *Agave juice fermentation and chemical composition studies of some species.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1 (3), 246-249.

Sánchez-Marroquín, A., Terán, J. & Piso, J. (1957). *Estudios sobre la microbiología del pulque, XVIII.* Revista de la Sociedad de Química México (1), 167-174.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial-SECOFI. (1972a, 26 de septiembre). NMX-V-022-1972. *Aguamiel.* Publicada en el Diario Oficial de la Federación, México: Dirección General de Normas Mexicanas.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial-SECOFI. (1972b, 26 de septiembre). NMX-V-037-SECOFI-1972. *Pulque manejado a granel.* Publicada en el Diario Oficial de la Federación, México: Dirección General de Normas Mexicanas.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP. (2013). *Censo agropecuario y pesquero.* Recuperado el 22 de noviembre de 2015 de http:// www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351.

Shultes, R. E. (1979). *Plants of the gods: Origin of hallucinogenic use.* MacGraw Hill, Nueva York, EUA.

Soberón-Mora, A. (1998). *El pulque: elixir milenario.* En J. M. Muriá (Ed.), *Beber de tierra generosa. Historia de las bebidas alcohólicas en México* (pp. 4-9). Fundación de Investigaciones Sociales, México.

Steinkraus, K. (1996). *Mexican pulque.* En K. Steinkraus (Ed.), *Handbook of Indigenous Fermented Foods* (pp. 389-397). Marcel Dekker Inc., Nueva York, EUA.

Stoopen, L. (1999). *Cuantificación de endotoxinas en bebidas alcohólicas y no alcohólicas.* Tesis de Licenciatura. Universidad Iberoamericana, México.

Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., *et al.,* (2016). *Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque.* Applied Microbiology Biotechnology 100, 385–396

Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca-Morales, R., López-Munguía, A., Bolívar, F. & Escalante, A. (2014). *Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by Leuconostoc kimchii isolated from traditional fermented pulque beverage.* Springer Plus (3), 583.

Ulloa, M., Herrera, T. & Lappe-Oliveras, P. (1987). *Fermentaciones tradicionales indígenas de México.* Serie de Investigaciones Sociales, 16. Instituto Nacional Indigenista, México.

Vallejo, C. (1992). *Los códices prehispánicos.* México Desconocido, 180, 30-41.

Vargas, L. A., Aguilar, P., Esquivel, M. G., Gispert, M., Gómez, A., Rodríguez, H., Suárez, C. & Wacher, C. (1998). *Bebidas de la tradición*. En J. M. Muria (Ed.), *Beber de tierra generosa. Historia de las bebidas alcohólicas en México* (pp. 168-203). Fundación de Investigaciones Sociales, México.

Vargas, L. A. (1999). *El pulque en la cultura de los pueblos indígenas.* En Fundación de Investigaciones Sociales (Ed.), *El pulque, la cultura y la salud.* Cuadernos de Investigación FISAC, 1 (2), 12-21.

Vázquez-Díaz, E., García-Nava, R., Peña-Valdivia, C., Ramírez-Tobías, H. & Morales-Ramos, V. (2011). *Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck).* Revista Fitotecnica Mexicana, 34 (3), 167-173.

Vázquez-García, J. A. (2007). *Agaves del occidente de México.* Universidad de Guadalajara-Departamento de Botánica y Zoología, Instituto de Botánica, Guadalajara, Jalisco, México.

Velázquez, L. (2015). *Comiteco, destilado con esencia a Comitán.* Corre la voz México. Recuperado el 11 de noviembre de 2015 de http://correlavoz.mx/?p=2102

Villaseñor-Gómez, A. & León-Yvarra, L. M. (2006). *Villa Madero: historia de un pueblo en la sierra michoacana.* Ayuntamiento de Villa Madero, Michoacán, México.

Wacher-Rodarte, C., Diaz-Ruiz, G., Moreno-Terrazas, R. & Lappe-Oliveras, P. (2014). *Alimentos fermentados indígenas de México.* En I. Guerrero-Legarreta, B. E. García-Almendparez, M. C. Wacher-Rodarte & C. Regalado-González (Eds.), *Microbiología de los alimentos* (pp. 373-403). Limusa, México.

Wanick, M. C. (1970). *Cura de vaginitis de etiologia variada pelo emprego cultura de Zymomonas mobilis (Lindner).* Revista del Instituto de Antibióticos 10, 47-50.

Wikipedia. (2016). *Raicilla (bebida).* Recuperado el 22 de octubre de 2016 de: https://es.wikipedia.org/wiki/Raicilla_(bebida)

Yanes, G. (2003). *El maguey de bacanora (Agave angustifolia).* Entorno (11), 5-8.

4. APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS

Sánchez-Carmona, A., Magaña G., Amaya-Delgado, L., Arreola-Vargas, J., López-Miranda, J., López-López, A. (†), Mendez-Acosta, H.O., Ordaz-Hérnández, A., Ortega-Sánchez, E.,Torres-Martínez, D., Téllez-Jurado, A., Velez-Jiménez, A., Villalobos-Serrano, L.F., Dávila-Vázquez, G. (†), Contreras-Ramos, S.M.

RESUMEN

Dentro de la cadena del agave se generan residuos de los cuales destacan los derivados de la producción de mezcal o tequila, como son las pencas, el bagazo y las vinazas. Aunque se ha buscado aprovechar o disponer de manera adecuada de las vinazas, hasta la fecha no se cuenta con un proceso o algún tratamiento que utilice en su totalidad estos residuos. Sin embargo, existen avances en ramas diferentes y variadas investigaciones que muestran que los residuos del agave tienen potencial para ser aprovechados en la obtención de biocombustibles líquidos o gaseosos, de enzimas o compuestos bioactivos, de biofertilizantes, entre otros. Actualmente, algunas refinerías en el mundo se encuentran en etapas de transformación bioquímica con altos rendimientos. Las alternativas para lograr mejor rentabilidad o una sostenibilidad ambiental mayor están relacionadas con el uso de múltiples materias primas de forma simultánea, la reducción en costos directos de operación/capital o mejoras en etapas de proceso no relacionadas directamente con la producción de biocombustibles, como pueden ser el uso eficiente del agua durante el proceso de reutilización de dióxido de carbono (CO_2), o la cogeneración de electricidad y calor.

Por lo tanto, el empleo de los residuos del agave presenta grandes oportunidades tanto en la investigación básica y aplicada, como en el desarrollo tecnológico. Esto incluye el explorar la evolución de las biorrefinerías en la producción de productos de alto valor agregado a partir de los componentes lignocelulósicos de los residuos del agave (celulosa, hemicelulosa y lignina), así como para la producción de biocombustibles en escalas adecuadas al sector agrícola mexicano.

Palabras clave: *Bagazo, bioactivos, biocombustibles, vinazas, residuos.*

4.1 INTRODUCCIÓN

De la industria del agave, ya sea por producción de tequila o mezcal, se obtienen residuos líquidos (vinazas) y sólidos (bagazo y pencas), cuya producción aumenta de manera paralela. En la última década, dado el auge en la demanda del tequila y la globalización alcanzada por la industria tequilera, las empresas han intentado reforzar los trabajos de tratamiento de residuos con la finalidad de atender así su responsabilidad social y ambiental. Recientemente se han desarrollado soluciones aplicando diferentes procesos para el tratamiento de agua. Algunos tratamientos se pueden mejorar y existe la convicción de sustituir procesos de baja tecnología por otros de alta tecnología.

Ha sido identificada además, la necesidad de implementar proyectos regionales de solución. Considerando que la solución a este reto debe abordarse por etapas y por tamaño de empresa (ya que la industria se conforma hoy por grande, mediana, pequeña y micro), lo cual hace que la problemática sea más difícil de abordar con soluciones generales. Actualmente las empresas se encuentran trabajando con sistemas de composteo y de tratamiento de alta tecnología, lo cual implica grandes inversiones de capital.

De manera general podemos establecer los siguientes retos y necesidades:

1. Apoyo de la autoridad para implementación de soluciones probadas de baja tecnología (centros de composteo y sistemas de riego), que sean adecuadamente aplicadas y estudiadas para los distintos tipos de suelo.
2. Realizar investigación avanzada que mejore los procesos y las opciones mediante proyectos estratégicos: investigación y evaluación de alternativas tecnológicas adecuadas a las pequeñas y medianas empresas (PYMES) para el tratamiento de efluentes de la industria.
3. Financiamiento para implementar soluciones tecnológicas, la inversión en soluciones integrales para medianos y pequeños productores. Para una planta productora que genera 400 m^3 de vinaza, se estima una inversión de 7 millones de dólares estadounidenses.

El tratamiento de residuos es un reto para el sector, ya que éstos presentan características particulares que no se observan en otros efluentes, por lo que se necesita sumar esfuerzos con instituciones, universidades, centros de desarrollo tecnológico y los distintos niveles de gobierno, para poder desarrollar tecnologías que ayuden a solucionar la situación. Por otro lado, los residuos sólidos como el bagazo representan una oportunidad de generar subproductos con valor agregado como biocombustibles, enzimas, compuestos bioactivos, entre otros. Sin embargo, es necesario que se establezcan procesos tecnológicos rentables y sustentables para su extracción y producción.

A continuación se abordan cada uno de los residuos que se generan desde la cosecha de la planta de agave en el campo y en su procesamiento para la producción de tequila y en su caso de mezcal.

4.2. RESIDUOS DE AGAVE

Pencas generadas de la jima de agave tequilana, en campo agavero de la destilería "La Alteña". Arandas, Jalisco.

» *Pencas*

Dentro de la cadena Agave-Tequila los primeros residuos sólidos que se generan en la producción son las hojas del rosetón de agave, que permanecen en el campo al cosechar las piñas o cabezas. Del porcentaje aprovechable de la planta, la piña corresponde únicamente 54% del peso húmedo; del resto (32%) es utilizable por los azúcares y la fibra, las hojas que aparentemente no tienen utilidad representan 14%. Sin embargo, su contenido de azúcares reductores totales, en la parte superior y en la base es de 16.1% y 13.1% respectivamente, lo que las hace susceptibles de algún aprovechamiento (Íniguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Las hojas presentan de 90 cm a 120 cm de longitud y de 8 cm a 12 cm de ancho en promedio, y contienen fibras que van de 23 cm a 52 cm de largo y 0.6 mm a 13 mm de ancho. La fibra más fina tiene en promedio 1.6 mm de largo y 25 μm de ancho.

Existen algunos estudios relacionados con el aprovechamiento de las pencas de agave, como la utilización de sus fibras, extracción de compuestos bioactivos como las sapogeninas, obtención de fructoligasacaridos (FOS), o azúcares fermentables para producción de biocombustibles, entre otros, los cuales se describirán con mayor detalle en secciones posteriores del presente capítulo.

La generación de pencas en los últimos 10 años se presenta en la Figura 4.1 donde se observa que la mayor producción de pencas se dio en el 2008, con 900 ton, pero desde entonces la producción ha ido reduciendo hasta 600 ton en el 2014. Estos datos muestran un volumen de generación de un residuo que aparentemente no tiene usos hasta el día de hoy; sin embargo, tiene un potencial biotecnológico para la generación de diferentes productos, que siguen sin explotarse a gran escala. Estos datos son reportados por la industria del tequila pero la generación de pencas de otro tipo de agave, como por ejemplo el mezcal, debe ser similar debido al uso intensivo del cultivo.

» *Bagazo y vinazas*

En el proceso industrial de producción de tequila o mezcal se generan desechos sólidos, líquidos y/o gaseosos, principalmente vinazas y bagazo, ambos con grandes contenidos de materia orgánica y compuestos minerales, cuyas concentraciones y características abren la posibilidad de desarrollar e implementar procesos de tratamiento y transformación orientados a aprovechar y obtener subproductos con valor agregado. Se estima que por cada litro de tequila producido al 55% Alc/Vol., se generan alrededor de 10 L de vinazas y 1.4 kg de bagazo (60% de humedad promedio). La producción de tequila (55% Alc/Vol.) en el año 2014 fue de 176.3 millones de litros,

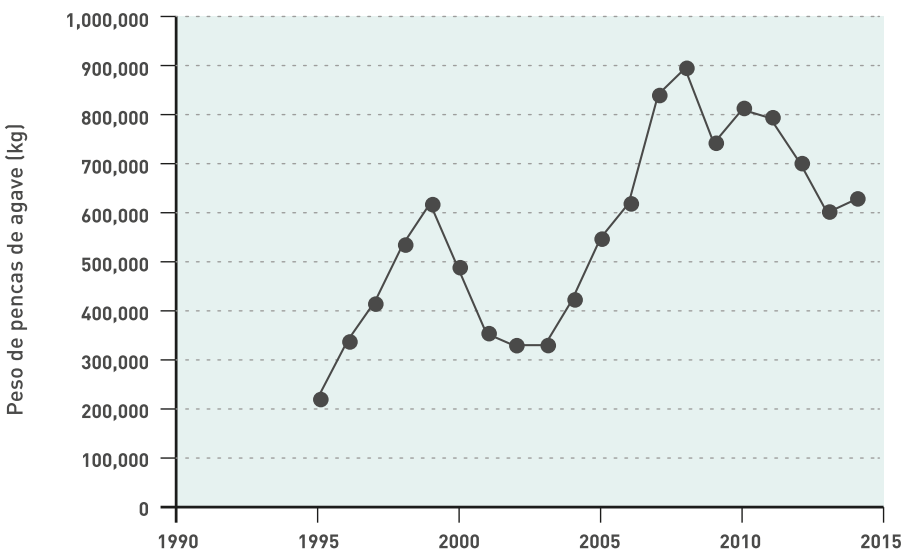


Figura 4.1 Generación de pencas de agave por la industria del tequila en los ultimos 10 años. Fuente: Elaboración propia con base en datos del CRT (2015).

aproximadamente 80% fue generada por las empresas grandes (CNIT, 2014); esto implica aproximadamente 245 millones de kilogramos de bagazo y 1763 millones de litros de vinaza en el 2014 (Figura 4.2).

El volumen de vinazas representa 88,145.5 ton de materia orgánica medida como demanda bioquímica de oxígeno (DBO) que de no ser tratada en su totalidad sería equivalente a la contaminación anual de una población de 5 millones de habitantes.

Las vinazas son desechos líquidos que se generan y permanecen en el fondo del alambique después de la destilación del mosto de agave fermentado, se definen como un residuo líquido compuesto de sustancias no volátiles. En las vinazas permanecen las fibrillas de agave que no se retuvieron en la etapa de filtración del jugo, células de levadura agotada, azúcares residuales, ácidos, ésteres, alcoholes superiores, sustancias que dan color caramelo, etc., aunque estos efluentes no son clasificados como residuos peligrosos, son considerados aguas residuales complejas (Llangovan *et al.*, 1996; Linerio, 2002). La composición de las vinazas es muy variable entre empresas y también dentro de una

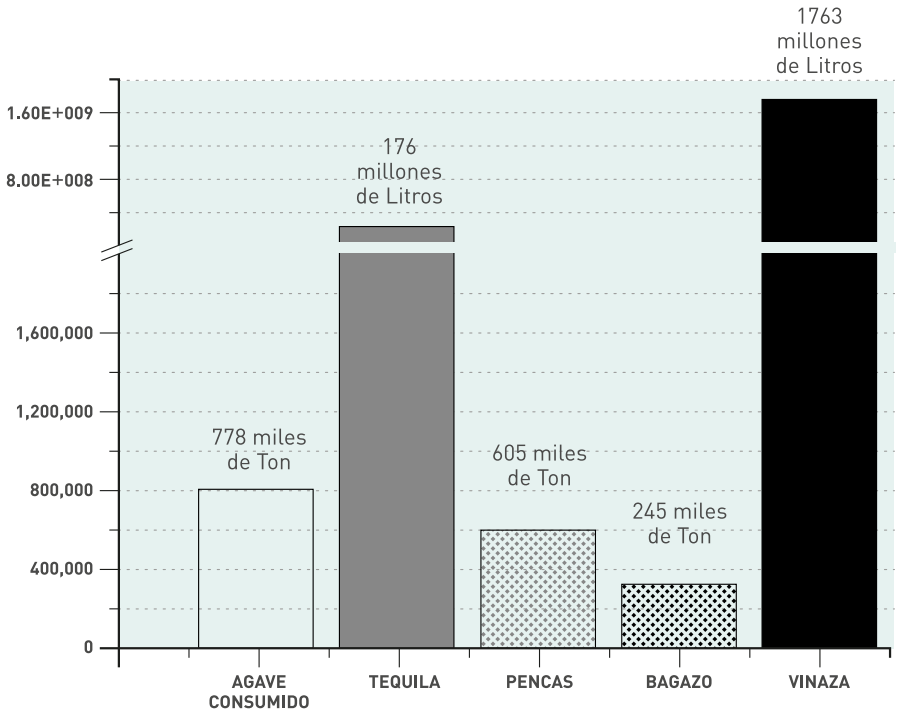


Figura 4.2 Consumo de agave, producción de tequila y generación de residuos para 2014 por la industria del tequila. Fuente: Elaboración propia con base en datos de la CNTC (2014).

misma destiladora, siendo el proceso de producción un factor determinante, es decir, si se elabora tequila 100% agave o tequila 51%. En general, la vinaza es retirada de los alambiques a una temperatura del orden de 90°C, pH < 4 y una demanda química de oxígeno del orden de 40000-80000 mg/L y sólidos totales del orden de 35000 mg/L (López-López *et al.*, 2010).

Frente a esta problemática ambiental, los procesos bilógicos de tipo anaerobio se han presentado como una alternativa de solución para el tratamiento de las vinazas, pues además de reducir la concentración de contaminantes, da la posibilidad de recuperar el metano e hidrógeno como fuentes potenciales de energía dentro del mismo proceso de producción del tequila (López-López *et al.*, 2010; 2015; Montes-Moncivais *et al.*, 2008). Actualmente, sólo las empresas grandes dan tratamiento a sus vinazas antes de ser descargadas al suelo, cuerpos de agua y alcantarillado municipal, mientras que las empresas pequeñas y medianas no tienen el recurso financiero para este fin. A pesar de los esfuerzos de consultores, instituciones y grupos de investigación para adaptar y desarrollar procesos biológicos y fisicoquímicos para el tratamiento de vinazas, éstos han sido insuficientes para dar una solución técnica y rentable para cumplir la normatividad. Adicionalmente la tecnología comercial convencional (floculación-coagulación, lodos activados y las variantes de éstos) se encuentra orientada al tratamiento de aguas residuales municipales u otros efluentes residuales con diferentes características fisicoquímicas a las vinazas tequileras. Esta situación ha complicado el tratamiento de las vinazas, pero sobre todo ha puesto en incertidumbre la inversión de los empresarios tequileros que desean tratar sus efluentes y cumplir con las normas ambientales. En este sentido, el desarrollo de una tecnología que presente viabilidad técnica y económica sigue siendo un reto.

4.3. PROCESOS

Las plantas de procesamiento de biomasa lignocelulósica se identifican con el término "*biorrefinería*", ésta integra procesos de conversión de biomasa y el equipamiento para producir carburantes, energía y químicos de alto valor agregado a partir de biomasa. El concepto de biorrefinería es análogo al de las refinerías clásicas, que producen diversos carburantes y productos a partir del petróleo (Kramm *et al.*, 2010). Las biorrefinerías se han identificado como una alternativa prometedora en la creación de una bioeconomía sostenible para la obtención de productos químicos de alto valor agregado y energía (Sadhukan *et al.*, 2014). Últimamente, las biorrefinerías han recibido mayor atención debido a la creciente concientización sobre la finitud de los combustibles fósiles y que por tanto, en los próximos años los biocarburantes serán una alternativa atractiva, incluso desde la perspectiva económica. Aunque las biorrefinerías son generalmente asociadas a la producción de biocarburantes como el bioetanol y el biodiesel, la producción exclusiva de éstos exhiben bajas rentabilidades (Sanchez *et al.,* 2014a; US DOE, 2015).

Las plantas de procesamiento de biomasa lignocelulósica se identifican con el término "biorrefinería"

No obstante, ejemplos como el de Brasil, uno de los mayores productores de bioetanol -con una producción total de 27.5 mil millones de litros de etanol al año-, ha demostrado que el bioethanol es un negocio sustentable y redituable a gran escala. Diversas definiciones y clasificaciones de biorrefinerías se pueden encontrar en la literatura. Para fines de esta red temática en la que la biomasa estudiada se puede clasificar como biomasa lignocelulósica, las biorrefinerías pueden clasificarse de acuerdo a su plataforma de proceso (Kramm *et al.*, 2010):

- Biorrefinerías bioquímicas que incluyen etapas de biorreacción para la transformación de los polisacáridos involucrados en productos de interés, tales como la sacarificaciones enzimáticas y fermentaciones alcohólicas para la producción de bioethanol.
- Biorefinerías termoquímicas que hacen uso de operaciones unitarias y etapas de reacción exclusivamente termoquímicas, por ejemplo el proceso "*Fischer-Tropsch*" para la producción de biodiesel.
- Biorrefinerías de doble plataforma que incluyen una combinación de plataformas bioquímicas y termoquímicas.

4.4. BIOCOMBUSTIBLES LÍQUIDOS

El uso de biocombustibles en motores de combustión interna presenta varias ventajas, entre ellas se pueden mencionar la disminución del uso de oxidantes químicos en las gasolinas ya que el etanol en sí, aporta el oxígeno para mejorar la combustión de las gasolinas. Esto implica entonces, que el bioetanol puede utilizarse en mezcla con gasolina tal y como sucede en Brasil y en Estados Unidos. Estos países producen 73,406 millones de litros de etanol utilizando como materia prima bagazo de caña de azúcar y maíz respectivamente (Renewable Fuels Association, [RFA] 2013).

Los biocombustibles de segunda generación, [...] presentan muchas ventajas [...] debido a que no contribuyen a la emisión de gases invernadero.

En México la producción de etanol a partir de la caña de azúcar fue de 15.5 millones de litros en 2012 (Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar, 2015) pero este alcohol es utilizado en la industria de las bebidas espirituosas, farmacia, química y de cosméticos (Barrera *et al.*, 2015) habiendo un enorme déficit, ya que la demanda sobrepasa la producción de etanol. Los biocombustibles de segunda generación, producidos a partir de residuos no destinados a la alimentación, presentan muchas ventajas desde el punto de vista ambiental debido a que no contribuyen a la emisión de gases invernadero. La composición química de los residuos lignocelulósicos es muy variada puesto que depende del origen del residuo vegetal; sin embargo, es importante resaltar que la presencia de carbohidratos representa más del 60% del peso total de este tipo de residuos (Menon y Rao, 2012).

El género *Agave* es un cultivo que esta adaptado a condiciones semiáridas, contiene 140 especies y es el cultivo más importante económicamente hablando en México, al ser la materia prima para la producción de tequila (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001). Los residuos generados de la producción de tequila han sido destinados para generar diferentes productos como combustibles, composta o como complementos alimenticios de animales. Los residuos del agave son ricos en celulosa lo que los hace de gran interés biotecnológico. La composición química también es muy variable no obstante que alrededor del 40% es celulosa, 15% lignina y cerca del 19% es hemicelulosa. De aquí surge la importancia de utilizar dicha planta como materia prima para la obtención de azúcares fermentables en la producción de etanol combustible.

Se estima que en la zona de Denominación de Origen Tequila (DOT) se tienen sembradas alrededor de 138,236 ha de *Agave tequilana* Weber var. azul (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2009), que generan cerca 352,000 ton métricas de bagazo por año, una vez procesado. Una gran ventaja de la utilización del bagazo del agave es la concentración geográfica del residuo; es decir, la mayor parte del bagazo está disponible en una pequeña área lo que representa una gran ventaja respecto al bagazo de caña de azúcar, por lo que su colecta tendría bajo costo

económico además de estar disponible todo el año; requisitos necesarios para el éxito de las biorrefinerías (Barrera *et al.*, 2015). Previo al uso de estos residuos es imprescindible el desarrollo de una tecnología que garantice la eliminación de la lignina y la posterior hidrólisis de los polímeros de celulosa y hemicelulosa así como los máximos rendimientos en la fermentación para la obtención de etanol. Para ello, se han desarrollado una gran variedad de pretratamientos de los residuos lignocelulósicos con la finalidad de extraer la mayor parte de la lignina presente en este tipo de residuos. Un pretratamiento efectivo se caracteriza por cumplir con varios criterios que son indispensables para una mayor obtención de carbohidratos y de la eliminación de la mayor parte de la lignina (Banerjee *et al.*, 2010). El uso de líquidos iónicos para el pretratamiento de residuos lignocelulósicos ha cobrado gran popularidad, ya que estos líquidos son capaces de disolver eficientemente carbohidratos y lignina además de que también es factible la separación de carbohidratos fácilmente una vez hidrolizados (Abe *et al.*, 2010). El pretratamiento alcalino es uno de los más utilizados pues la sosa (NAOH) es capaz de solubilizar la lignina de los residuos dejando casi intacta a las celulosas presentes (Singh *et al.*, 2014), la combinación de los tratamientos alcalinos con la temperatura hace mas eficiente la solubilización de la lignina y en algunos casos, se alcanza la solubilización completa (Talebnia *et al.*, 2010). En otros casos se ha recurrido a soluciones de hipoclorito de sodio en medio ácido obteniéndose buenos resultados en la extracción de la lignina (Hubbell y Ragauskas, 2010). También han sido empleados otros pretratamientos químicos como es el uso de medios alcalinos en presencia de peróxido combinados con hipoclorito de sodio. Después del pretratamiento sigue la sacarificación que puede ser química o biológica. Este proceso se enfoca en la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa residual que queda después de los pretratamientos. Generalmente la hidrólisis química se lleva a cabo con ácidos minerales como el ácido clorhídrico (HCL) y sulfúrico (H_2SO_4) bajo condiciones muy suaves para evitar la descomposición de los carbohidratos (Hernández-Salas *et al.*, 2009). Por otra parte, la hidrólisis biológica utilizando complejos enzimáticos es una técnica muy común. Las enzimas hidrolíticas utilizadas pueden ser de origen bacteriano o fúngico.

En el caso de las enzimas bacterianas son muy favorecidos los complejos enzimáticos llamados celulosomas (Menon y Rao, 2012), los cuales mejoran considerablemente los procesos catalíticos por ser complejos enzimáticos los responsables de las reacciones catalíticas y no enzimas aisladas. Las fuentes de enzimas hidrolíticas más citadas provienen de los hongos filamentosos sobresaliendo el género *Trichoderma* debido a que produce enzimas extracelulares que son muy estables y eficientes (Saddler *et al.*, 1998). Para la hidrólisis de los residuos de agave es común también utilizar cocteles de enzimas hidrolíticas que son más eficientes que una enzima; estas mezclas de enzimas están compuestas por una gran diversidad de enzimas hidrolíticas que presentan funciones catalíticas complementarias e inclusive sinérgicas, que al final del proceso hidrolítico, rinden grandes cantidades de monosacáridos.

» *Problemática*

La producción de bioetanol a partir de residuos del agave (bagazo) es muy factible por su alto contenido de celulosa lo que facilitaría la fermentación posterior de los monosacáridos presentes en los hidrolizados del agave. Uno de los principales retos es la optimización de los procesos hidrolíticos de naturaleza biológica, ya que el costo de las enzimas aún resulta ser muy costoso comparado con los procesos de origen químico. Sin embargo, el bajo precio de la materia prima puede ser un incentivo para generar una industria que tenga como base, el bagazo del agave. Por otra parte, la presencia de otros monosacáridos específicamente de las pentosas provenientes de la hemicelulosa pueden interferir en los procesos fermentativos. La concentración de estos monosacáridos representa casi una cuarta parte de la composición del agave, que bajo los métodos tradicionales de fermentación no son aprovechados por los microorganismos. Existe varios grupos de investigación tanto a nivel nacional como internacional que han enfocado sus esfuerzos en mejorar determinados microorganismos para que sean capaces de fermentar tanto pentosas como hexosas y de esta forma, aumentar los rendimientos en la producción de etanol haciendo más atractivo el uso de materiales lignocelulolíticos.

El bagazo de agave presenta un gran potencial biotecnológico para la producción de bioetanol principalmente por su contenido de hexosas que hacen menos complicado los procesos fermentativos. Se cuenta con la tecnología para generar procesos hidrolíticos en la obtención de jarabes destinados a la producción de etanol.

Los residuos del agave se encuentran focalizados en una zona geográfica definida, lo que facilitaría generar una industria de biorrefinerías que lo tomaran como base, además de sumar su disponibilidad durante todo el año lo que garantizaría el éxito de este tipo de industria.

» *Sostenibilidad en las biorrefinerías*

Los biocombustibles líquidos obtenidos a partir de materias primas lignocelulósicas jugarán un rol importante en el corto plazo como reemplazo de los combustibles fósiles para el sector del transporte (Tanaka, 2011). Recientemente se han propuesto diversas directivas gubernamentales que promueven la producción y el uso de estos biocombustibles. Por ejemplo, la comunidad europea ha sugerido que para el año 2020 los biocombustibles de segunda generación (2G) contribuyan con 0.5% al sector del transporte. La Renewable Fuels Standard (RFS) estableció que del total de combustibles renovables que se usarán para el 2022, 60 mil millones de litros deben ser producidos de biomasa lignocelulósica (USEPA, 2010), lo que representa una gran oportunidad en la implementación de tecnologías de plataforma bioquímica para la producción de biocombustibles lignocelulósicos. Además, la evaluación de la sostenibilidad de estos biocombustibles se ha convertido en una cuestión apremiante debido a que su producción conlleva impactos ambientales, económicos y sociales. Algunos de los impactos ambientales como la generación de cantidades considerables de Gases de Efecto Invernadero (GEI) (Azapagic *et al.*, 2006), el consumo de grandes cantidades de agua fresca y el cambio en la vocación y uso de tierras de cultivo, así como otros

impactos indirectos son considerados en la mayoría de los métodos de análisis de ciclo de vida (ACV) y las diferentes evaluaciones de sostenibilidad (AS). La Directiva de Energías Renovables de la Unión Europea ha establecido algunos criterios específicos para la producción y uso de los biocombustibles. Estos criterios están enfocados principalmente en la reducción de los GEI y en la protección de las tierras con gran biodiversidad o almacenamiento de carbón (European Parliament, 2009). Por lo tanto, la consideración de los aspectos económicos y sociales en los métodos y herramientas de ACV y AS es un tema de gran relevancia. La mayoría de los métodos actualmente disponibles han sido desarrollados para respaldar los procesos de toma de decisiones basados en perspectivas macro-económicas, evaluando las etapas del proceso de producción (por ejemplo las biorrefinerías) en términos muy generales.

El bagazo de agave presenta gran potencial biotecnológico para la producción de bioetanol

Para las tecnologías prospectivas que todavía no están comercialmente disponibles, tales como las de producción de biocombustibles lignocelulósicos, la mayoría de los métodos y herramientas de ACV y AS evalúan la sostenibilidad económica y ambiental de los procesos de producción basados tanto en modelos que no proveen datos precisos o modelos que no corresponden a las tecnologías analizadas. Recientemente han surgido diversos enfoques basados en principios de ingeniería de procesos tratando de solucionar este problema (Azapagic *et al.*, 2006; Dunn *et al.*, 2013; Martinez-Hernandez *et al.* 2013; Poudelet *et al.*, 2012; Sacramento-Rivero, 2012). Cada uno de estos métodos define sus categorías e indicadores de sostenibilidad de acuerdo con diferentes criterios. Por ejemplo, Sanchez *et al.*, (2016) desarrollaron un método con un enfoque de ingenierías de procesos empleando modelos matemáticos rigurosos para evaluar la sostenibilidad económica y ambiental de las biorrefinerías para la producción de biocombustibles avanzados. Los indicadores de sostenibilidad para los dominios económico y ambiental están definidos y ponderados conforme a un marco de sostenibilidad considerando condiciones socio-económicas específicas (Azapagic *et al.*, 2006; Global Bioenergy Partnership, 2011; Ishizaka y Nemery, 2013). Además del análisis de sostenibilidad, este método provee información para identificar las actividades y etapas del proceso que contribuyen en mayor porcentaje con la sostenibilidad de la biorrefinería que está siendo evaluada. El método fue demostrado con el análisis comparativo de dos diferentes diseños de biorrefinerías conceptuales para la producción de biocombustibles que podrían ser ubicadas en México, como ejemplo de un sector agrícola de tamaño mediano. En la actualidad este método se utilizó para realizar el diseño conceptual de una biorrefinería que trata vinazas tequileras como parte del proceso de producción de biocombustibles (Sanchez *et al.*, 2016).

4.5. BIOCOMBUSTIBLES GASEOSOS

Bagazo siendo retirado del alambique, en el "Palenque Destilería Los Danzantes", Santiago Matatlán, Oaxaca.

» *Utilización de vinazas tequileras y bagazo, como sustrato para la digestión anaerobia*

En México, los trabajos de digestión anaerobia con vinazas tequileras se iniciaron a principios de los años noventa en reactores empacados, reactores anaerobios de lecho de lodos y flujo ascendente Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) y filtros anaerobios (Pinedo 1990; García-Dueñas 1991). Estos autores reportaron rendimientos moderados de reducción de materia orgánica medida como demanda química de oxígeno (DQO), de entre 50% y 70%; debido a la ausencia de lodos anaerobios con actividad metanogénica adecuada y a la falta de adaptación al

sustrato. La alimentación de vinazas en reactores de película fija la reportó Voellger (2000), quien usó un filtro anaerobio, con piedra pómez como material de soporte. El sustrato fue vinaza, con una DQO de 54000 mg/L y pH de 3.3. El arranque se inició por lote, alimentando vinaza en una concentración de 1.5 g DQO/L, con adición de nutrientes (Nitrógeno y fósforo) la concentración se incrementó a 9 g DQO/L, con adición de metanol y acetato de sodio, para favorecer el desarrollo de bacterias metanogénicas. En la experimentación en continuo la concentración de materia orgánica se incrementó de 7.25 g DQO/L hasta 20.58 g DQO/L. La mayor remoción de DQO (90%) se observó aplicando una carga orgánica volumétrica (COV) de 9.9 g DQO/L/d y un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de dos días.

Para evaluar el efecto de recirculación de la vinaza sobre el pH del reactor, Álvarez *et al.*, (1995) realizaron el arranque mediante incrementos escalonados de carga orgánica volumétrica en dos reactores UASB, con y sin recirculación (relaciones 1:100 y 1:800). En este caso la recirculación permitió alimentar cargas mayores hasta de 22 g DQO/L-d y se obtuvo una remoción de DQO del 86%. El objetivo logrado fue diluir la materia orgánica inicial y el efecto de los ácidos de cadena corta o ácidos grasos volátiles (AGVs) generados. En trabajos más recientes, se reconoce que el pH inferior a 6.5, la acumulación de AGVs, la presencia de compuestos inhibitorios, el manejo de la acidez-alcalinidad en las vinazas son factores importantes a considerar para la estabilidad del proceso y en esquemas de control y automatización de digestores anaerobios (Méndez-Acosta *et al.*, 2011; López-López *et al.*, 2015). Además, dada la estacionalidad de la producción de tequila en las pequeñas y medianas empresas, recientemente se ha evaluado el desempeño de un sistema piloto con buenos resultados, el cual podría aplicarse con éxito en dichas empresas (Jauregui-Jauregui *et al.*, 2014). Los trabajos citados, ponen de manifiesto la mayoría de los esfuerzos que se han hecho para lograr la estabilidad y eficiencia de la metanogénesis a partir de vinazas tequileras.

Además de las vinazas, estudios recientes han demostrado la factibilidad técnica de utilizar hidrolizados ácidos de bagazo de agave (cocido y sin cocer) para la producción de biogás. En ese trabajo se utilizó un reactor anaerobio en lote secuencial (AnSBR) y se mostraron mejores resultados sin adición de nutrientes, usando bagazo sin cocer (Arreola-Vargas *et al.*, 2015).

» *Necesidad de estudiar la producción de hidrógeno a partir de vinazas y de bagazo*

Existe un creciente interés en la producción de hidrógeno (H_2) por vía biológica, a partir de residuos orgánicos, principalmente debido al alto contenido energético como H_2 y a que en su aprovechamiento para producir energía sólo se generan agua y calor como subproductos (Davila-Vazquez *et al.*, 2008). Existen algunos reportes sobre el aprovechamiento de vinazas para la producción de hidrógeno y/o ácidos grasos volátiles (Espinoza-Escalante *et al.*, 2008; Montes-Moncivais *et al.*, 2008; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009; Buitrón & Carvajal 2010; Buitrón *et al.*, 2014a; Buitrón *et al.*, 2014b; Marino-Marmolejo *et al.*, 2015; Moreno-Andrade *et al.*, 2015), todos ellos en el nivel laboratorio y mediante la versión trunca de la digestión anaerobia, obteniendo como productos gaseosos finales al hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2).

Espinoza-Escalante *et al.*, (2008) estudiaron el efecto de tres pretratamientos (adición de álcali, tratamiento térmico y sonicación) para aumentar la eficiencia de la hidrólisis de las vinazas en una etapa acidogénica en lote. Con base a los resultados obtenidos, estos autores consideran que la producción de H_2 a partir de vinazas es factible técnicamente. En otro estudio con experimentos en lote, los autores evaluaron la producción de H_2 a diferentes pH y temperaturas iniciales con vinazas tequileras y azucareras, concluyendo que las vinazas tequileras son mejores sustratos que las azucareras a temperatura mesofílica y a pH de 6.5 (Montes-Moncivais *et al.*, 2008). Por otro lado, Espinoza-Escalante *et al.*, (2009) estudiaron el efecto de tres parámetros de operación (TRH, pH y temperatura) en experimentos semi-continuos para eficientar la producción tanto de metano como de H_2, encontrando mejores resultados para producción de H_2 a pH = 5.5, TRH = 5 días y temperatura de 55°C.

Buitrón y Carvajal (2010) montaron en el nivel laboratorio, un sistema por lotes secuenciales y obtuvieron los mejores resultados en términos de productividad volumétrica, alimentado las vinazas a una concentración de 3 g DQO/L a 35°C y un TRH de 12 horas.

Los estudios más recientes han llegado a la producción de 1.3 mol H_2 mol/mol glucosa y 72 mL $H_2/(L_{reactor}\text{-}h)$ en un sistema en continuo utilizando una configuración de reactor de lecho empacado. En este mismo trabajo, los autores comentan que no existe inhibición de la producción de H_2 con las vinazas tequileras (Buitrón *et al.*, 2014b). Además, se han logrado acoplar sistemas en discontinuo con continuos, para la producción de H_2 y CH_4 en dos etapas, con una reducción de materia

orgánica acumulada del 75% (Buitrón *et al.*, 2014a). En los estudios mencionados anteriormente, se han utilizado vinazas con cierto grado de dilución, por lo que es posible que la presencia de compuestos inhibidores y/o tóxicos para las bacterias acidogénicas no tenga un efecto significativo. Vale la pena mencionar que se han iniciado trabajos para la producción de H_2 a partir de hidrolizados de bagazo de agave, lo cual se ha reportado por lo pronto en algunas tesis de maestría (Abreu-Sherrer 2013; Contreras-Dávila 2015).

Consideramos que los retos que existen en el campo de la producción de biocombustibles gaseosos a partir de subproductos del procesamiento del agave, se pueden abordar con el desarrollo que se expone a continuación:

Biogás:

» Investigación aplicada orientada al pretratamiento de los residuos agroindustriales, principalmente de origen lignocelulósico, que ayuden a mejorar la eficiencia de obtención de licores ricos en azúcares, con el menor contenido de sustancias potencialmente tóxicas.
» Desarrollo de nuevos diseños y configuraciones de reactores para llevar a cabo la digestión o co-digestión de residuos sólidos y semi-sólidos bajo diferentes regímenes de temperatura (mesofilia y termofilia).
» Desarrollar esquemas de monitoreo y control que permitan garantizar la estabilidad operacional de los procesos, así como maximizar su desempeño en la producción de biogás a pesar de los inconvenientes asociados a la operación de dichos procesos.

Hidrógeno (H_2):

» Investigación aplicada orientada al desarrollo de procesos robustos, estables y con elevado rendimiento.
» Investigación básica y aplicada enfocada a establecer las bases necesarias para poder realizar el escalamiento de los procesos que presenten el mejor desempeño.
» Sistemas de acondicionamiento de biomasa basados en cultivos hidrolíticos.
» Desarrollar sistemas fermentativos en continuo de alta densidad que permitan mejorar las velocidades de producción de biohidrógeno.
» Investigación aplicada sobre las estrategias de acoplamiento de configuraciones de sistemas fermentativos con celdas de electrolisis microbianas, con sistemas fotofermentativos o procesos de digestión anaerobia.
» Desarrollo de cepas genéticamente modificadas con altos rendimientos en la producción de biohidrógeno.
» Desarrollo de esquemas de monitoreo y control que permitan garantizar la estabilidad operacional de los procesos, así como maximizar su desempeño en la producción de biohidrógeno.

4.6. ENZIMAS

El agave se caracteriza por la producción de una alta cantidad de biomasa. Se estima que los agaves pulqueros pueden pesar más de 1 ton, por lo tanto la actividad industrial como la producción de tequila, pulque o mezcal genera una alta cantidad de biomasa potencialmente aprovechable. Tan sólo en la industria tequilera se procesan más de 1 millón de ton de agave por año (Huitrón *et al.,* 2008). Así, el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales puede tener diversas vertientes tales como servir de alimento para ganado, producir artesanías, extraer otros compuestos de interés comercial o bien obtener enzimas, sea para su comercialización o bien, para su aplicación en la obtención de nuevos productos como bioetanol, xilitol, jarabes de fructosa, etc. En la Tabla 4.1 se muestran los microorganismos, residuos de agave que se aprovechan, así como sus respectivas referencias.

Tan solo en la industria tequilera se procesan más de 1 millón de ton de agave por año

Las aplicaciones de las enzimas microbianas se han extendido de la industria de los alimentos (principalmente en bebidas) a la conversión de biomasa, tratamiento de residuos y, debido al incremento de las necesidades energéticas también se ha prestado mucho interés en la transformación de materia vegetal a carbohidratos simples. De acuerdo con la composición de los agaves, los residuos son candidatos potenciales para la producción de celulasas, inulinasas, xilanasas, lacasas y pectinasas.

» *Inulinasas*

La producción de inulina y de jarabes fructosados ha despertado interés debido a su bajo índice glicémico y su función prebiótica, la producción de estos productos está asociada a la actividad de las β-fructanasas (inulinasas). Éstas son producidas principalmente por hongos del género *Aspergillus* y levaduras del género *Kluyveromyces*. Al parecer las levaduras tienen mayor importancia industrial por tolerar temperaturas mayores y por ser reconocido generalmente como seguro (GRAS) (Huerta, 2014). En experimentos a nivel laboratorio se ha logrado transformar los fructanos a fructosa pura con rendimientos de hasta un 95% (Chi *et al.,* 2009), esto sugiere que se deben realizar estudios piloto para el escalamiento del proceso, los cuales deben ir acompañados de la búsqueda de nuevas cepas productoras de inulinasas, así como estrategias tecnológicas que lleven a la optimización del proceso.

» *Lacasas*

La producción de este grupo de enzimas se ha realizado en residuos de *Agave sisalana* y *tequilana* Weber; la atención se ha enfocado en el uso de hongos del género *Pleurotous* y cuándo la producción se realiza en medio sólido, existe la posibilidad de producir simultáneamente proteína (Mutemi *et al.,*2013). Aunque el contenido de lignina no es alto en

los agaves, la importancia de este grupo de enzimas radica en que su actividad facilitaría el ataque enzimático de los otros grupos de enzimas para llegar a la transformación de la materia vegetal en azúcares fermentables. A manera de perspectiva, también es necesario explorar nuevas cepas del grupo de pudrición blanca que en cultivo sólido han mostrado alta actividad de lacasa.

» *Celulasas*

Por su alto contenido de celulosa (al menos 60%), los residuos de agave representan un alto potencial en la producción de celulasas o bien en la obtención de azúcares a partir de un tratamiento enzimático (Huitrón, *et al.,* 2008) para la producción de bioetanol, bioturbosina, etc. Otro uso potencial de las fibras de agave, es emplearlas en unión con polímeros hidrofílicos, para ello es necesario modificar la superficie de las fibras a través de un tratamiento con enzimas celulósicas, aunque los logros aún no resultan mejores en comparación con el uso de compuestos químicos (Kalia *et al.,* 2012), es una posibilidad para que en el futuro se utilice la celulosa en muy diversas aplicaciones.

» *Xilanasas:*

La producción de estas enzimas usualmente están asociadas a la producción de celulasas, pues el objetivo principal es obtener azúcares simples a partir de la materia lignocelulósica del agave (Huitrón, 2008). Algunos estudios comparan el tratamiento enzimático con el tratamiento químico, resultando que en algunos casos el tratamiento con enzimas comerciales puede generar mejores rendimientos en la obtención de azúcares simples (Hernández, 2009). Por otro lado, no se ha explorado la producción y purificación de xilanasa para su aplicación en la industrial del papel y de los alimentos.

TABLA 4.1 Enzimas producidas o usadas en algún residuo de agave.

Enzima	Sustrato	Microorganismo	Aplicación	Referencia
Inulinasa	Residuos de *A. tequilana Weber* (piña y penca)	*Aspergillus Kluyveromyces*	Producción de fructosa	(Huitrón *et al.*, 2008; chi *et al.*, 2009)
Fructanasa	*A. tequilana*	*Kluyveromyces*	Producción de bioetanol	(Flores *et al.*, 2013)
Pectinasa	Residuo de: *A. tequilana* Weber (piña de agave azul)	*Aspergillus niger*	Jugos de frutas y textiles	(Huitrón *et al.*, 2008)
Xilanasa	Fibras de sisal	Formulado comercial	Blanqueado de papel	(Aracri y Vidal, 2011)

Fuente: Elaboración con base en las referencias citadas.

4.7. BIOACTIVOS

» *Xilitol*

El excesivo consumo mundial de azúcares –principalmente de jarabe de fructosa– ha contribuido a la generación de verdaderas epidemias de diabetes, obesidad y cáncer. México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil y también es primero en obesidad de mujeres adultas y segundo lugar mundial en adultos obesos y, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 9% de la población padece diabetes, la cual es la principal causa de muerte, con 17.2% del total. En Estado Unidos existen 25.8 millones de diabéticos y 70 millones de obesos diagnosticados y a nivel mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que hay aproximadamente 500 millones de obesos. Debido a lo anterior es necesario generar opciones saludables de edulcorantes de bajo costo y bajo contenido de calorías, para combatir dichos males y mejorar la salud de la población. Por ser un alcohol dulce y no requerir de insulina para ser metabolizado, el xilitol es considerado el edulcorante más saludable –con bajo contenido de calorías y de carbohidratos– y la Food and Drug Administration (FDA) aprueba su uso en todas sus modalidades.

Por ser un alcohol dulce y no requerir de insulina para ser metabolizado, el xilitol es considerado el edulcorante más saludable

El xilitol es un poliol, cuya molécula contiene cinco átomos de carbono. Es utilizado ampliamente como aditivo alimentario y sustituto edulcorante de la sacarosa, especialmente en pacientes diabéticos no dependientes de la insulina. También se ha utilizado en la prevención de la otitis y la osteoporosis y en la elaboración de productos de higiene oral, tales como gomas de mascar, pastillas, grageas y caramelos duros, como protector de las proteínas hidrosolubles, para impedir o reducir su desnaturalización, u otros daños. Junto con la D-fructosa y el sorbitol, el xilitol se convierte en D-glucosa y en los diversos metabolitos, producidos a partir de ella, durante el metabolismo intermedio. El xilitol se almacena en forma de glucógeno, se oxida a dióxido de carbono y agua, o se emplea como material de construcción para la biosíntesis de sustancias tales como los lípidos.

La industria está orientando sus esfuerzos hacia la producción biotecnológica del xilitol, utilizando microorganismos como *Candida* sp., *Hansenula polymorpha* y *Debaryomyces hansenii* (Domínguez *et al.*, 1997; Misra *et al.*, 2012; Ah, *et al.*, 1998; Suryadi *et al.*, 2000). En estos microorganismos, el xilitol se acumula como un

producto intermedio de la conversión de xilosa en xilulosa. En el primer paso, la xilosa se reduce a xilitol por medio de la enzima aldosa reductasa (EC 1.1.1.21): el xilitol producido se oxida para producir xilulosa, con la participación de la enzima xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9).

El bagazo de agave es un residuo lignocélulósico de importancia en México, la composición del bagazo de *A. tequilana* Weber es de 43% celulosa, 19% hemicelulosa y 15% lignina (Hongjia *et al.*, 2012). El xilano es uno de los componentes que se encuentra en mayor cantidad en la hemicelulosa y de su hidrólisis enzimática se puede obtener la xilosa para su posterior bioconversión en xilitol.

» *Saponinas*

Las saponinas son moléculas que están siendo utilizadas en la industria farmacéutica como precursores de esteroides (Sparg *et al.*, 2004). Una forma de identificar las saponinas es por su característica de formar soluciones espumantes, las saponinas son metabolitos secundarios presentes en diversas especies vegetales. Se han reportado la presencia de saponinas esteroidales en el agave. En México se encuentran 75% de las especies del género *Agave* (Zamora *et al.*, 2010), lo cual deja ver claramente el potencial de obtención de una gran variedad de saponinas que tengan una aplicación en la industria farmacéutica con diferentes actividades terapéuticas: antifúngicas, hemolítica, actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiparasitaria, antitumoral y antiviral (Sparg *et al.*, 2004).

» *Derivados de lignina*

La industria tequilera en México produce miles de toneladas de bagazo de agave en su gran mayoría de *A. tequilana* Weber; de estos residuos se puede extraer lignina, la cual tiene diferentes aplicaciones como los ligno-sulfonatos, compuestos que pueden ser utilizados como dispersantes de pesticidas, secuestradores de metales pesados y emulsificantes. Otra aplicación de la lignina puede incorporarse en resinas (fenol-formaldehído), y en diversos polímeros (poliuretanos-lignina, poliolefinas-lignina, etc). Si la lignina se modifica químicamente por fenolización, demetilación puede aplicarse en formulaciones de resinas o adhesivos (Chávez-Sifontes y Domine 2013).

4.8. BIOFERTILIZANTES

Una práctica común de diversas empresas consiste en elaborar biofertilizantes con sus residuos y con el proceso de composteo o degradación biológica controlada (fermentación sólida) de la mezcla de bagazo de agave, manejado como *"marrana"*, y los sólidos sedimentados de los residuos de la destilación, comúnmente conocidos como *"marranilla"*, regando las pilas de composta con vinazas. Esta mezcla se deja en promedio de 6 a 7 meses para su degradación. Sin embargo, no se han reportado datos de la calidad de la composta ni de su efecto en el rendimiento de cultivos cuando se utiliza en las prácticas agrícolas.

El uso de bagazo (caña, agave) ha sido probado por composteo mezclándolo con diferentes materiales como son las vinazas, sólidos del proceso del tequila y otros residuos de curtiduría (intestinos, piel y material de descarne), encontrando que es una buena alternativa para la utilización de este desecho (Iñiguez *et al.*, 2003; Iñiguez *et al.*, 2005). Sin embargo, es poco atractivo por el tiempo que lleva el proceso entre 6 y 7 meses. A pesar de esto, actualmente se

puede encontrar comercialmente composta de agave como material de jardinería, lo cual indica que se produce composta de agave y se comercializa a gran escala.

Otro proceso biotecnológico utilizado para el aprovechamiento del bagazo, es el vermicomposteo. En este proceso se utilizan lombrices que son capaces de convertir estos desechos a vermicomposta, conocido como "*humus de lombriz*", el cual contiene nutrientes disponibles para las plantas y microorganismos benéficos para el suelo. Utilizar el proceso de vermicomposteo permite reducir los tiempos del proceso de composteo (Sen y Chandra, 2007), pues una lombriz adulta consume en residuos lo equivalente a su propio peso en un día. De tal manera que pueden optimizarse tanto la densidad de población de lombrices, las mezclas y las condiciones para maximizar su consumo de residuos, reduciendo el tiempo de proceso. Otros autores combinaron el proceso de composteo y vermicomposteo con un pre-tratamiento con el hongo de pudrición blanca *Bjerkandera adusta* para acelerar el proceso de degradación (Moran-Salazar, *et al.*, 2015). Estos autores encontraron que el pre-tratamiento redujo el tiempo de proceso a 3 meses comparado con un proceso de composteo tradicional que dura entre 6 y 7 meses. Además de que con la adición del vermicomposteo obtuvo un producto maduro y estable para poderse aplicar como abono orgánico.

El potencial que tiene el bagazo de agave para la producción de biofertilizantes es muy grande por la recirculación de nutrientes en los propios cultivos de agave. Actualmente, algunas empresas tequileras están tratando de cambiar el proceso de composteo de bagazo a un proceso de vermicomposteo para reducir los tiempos y dar un manejo a los residuos de agave.

4.9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Algunas tecnologías de plataforma bioquímica ya han alcanzado una madurez suficiente como para ser implantadas en proyectos a escala commercial (Tanaka, 2014), corroborado por la inauguración en 2014 de tres biorrefinerías que usan biomasa de segunda generación (rastrojo de maíz, paja de trigo y residuos de madera) (Lane, 2014b; Sanchez *et al.*, 2014b). Sin embargo, en general las tecnologías de plataforma bioquímica distan mucho de haber llegado a un desempeño satisfactorio. Así que todas las etapas (pretratamiento, sacarificación enzimática, fermentaciones alcohólicas y aeróbicas, así como purificación) son sujeto de investigaciones intensas para lograr mejores rendimientos o estrategias de proceso novedosas. Respecto de las plataformas termoquímicas, el desarrollo está muy por detrás del que presentan las plataformas bioquímicas, por lo que la perspectiva para realizar investigación y desarrollo tecnológico es amplia. También es importante tener en cuenta que el incremento en la demanda de biomasa lignocelulósica traerá en el mediano plazo su revalorización, así como un cambio a la baja en su disponibilidad y su impacto, por consecuencia, en la economía de la producción de biocombustibles lignocelulósicos. Por ejemplo, Stephen *et al.*, (2011) mostraron el efecto de usar agro-residuos lignocelulósicos con diferentes capacidades instaladas de planta y concentraciones de polisacáridos en la materia prima (proporcionales al precio de la biomasa) en el costo total de producción (CTP) y en la eficiencia energética de biorrefinerías bioquímicas. En este trabajo se mostró que las capacidades mínimas (Lane, 2014a) que pueden ser factibles para las condiciones del sector agrícola mexicano rondan alrededor de las 500 ton (base seca) por día para así mantener los CTP 20% arriba de valores obtenidos en biorrefinerías a gran escala. Sanchez *et al.*, (2013) identificaron que para aquellas biorrefinerías que ya cuentan con etapas de transformación bioquímica con altos rendimientos, las alternativas para lograr mejores rentabilidades o una sostenibilidad ambiental mayor están relacionadas, ya sea con el uso de múltiples materias primas de manera simultánea, con la reducción en costos directos de

El incremento en la demanda de biomasa lignocelulósica traerá, [...] su revalorización, así como un cambio a la baja en su disponibilidad y su impacto

operación/capital o mejoras en etapas de proceso no relacionadas directamente con la producción de biocombustibles, como pueden ser el uso eficiente de agua de proceso la reutilización de dióxido de carbono (CO_2), o la cogeneración de electricidad y calor. Por lo tanto, el uso de los residuos del agave presenta grandes oportunidades tanto en la investigación básica y aplicada como en el desarrollo tecnológico. Esto incluye el explorar el desarrollo de biorrefinerías para la producción de productos de alto valor agregado a partir de los componentes lignocelulósicos de los residuos del agave (celulosa, hemicelulosa y lignina), así como para la producción de biocombustibles en escalas adecuadas al sector agrícola mexicano.

4.10 REFERENCIAS

Abe, M., Fukaya, Y. & Ohno, H. (2010, julio). *Extraction of polysaccharides from bran with phosphonate or phosphinate-derived ionic liquids under short mixing time and low temperature.* Green Chemistry, 12 (7), 1274-1280. DOI: 10.1039/C003976D.

Abreu-Sherrer, J. (2013). *Aprovechamiento de bagazo de Agave tequilana Weber para la producción de bio-hidrógeno.* Tesis de maestría no publicada. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

Álvarez, E., Linerio, J., Espinosa, A., Briones, R., Ilangovan, K. & Noyola, A. (1995). *Tratamiento anaerobio de vinazas tequileras en un reactor de lecho de lodos y flujo ascendente (UASB).* VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México.

Aracri, E. & Vidal, T. (2011, enero). *Xylanase and laccase aided hexenuronic acids and lignin removal from specialty sisal fibres.* Carbohydrate Polymers, 83 (3), 1355-1362. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.058.

Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-Gonzalez, R. I., Alatriste-Mondragon, F. & Mendez-Acosta, H. O. (2015, abril). *Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield.* Bioresource Technology, 181, 191-199. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.036.

Azapagic, A., Millington, A. & Collett A. (2006, junio). *A methodology for integrating sustainability considerations into process design.* Chemical Engineering Research and Design, 84 (6), 439-452. DOI: 10.1205/cherd05007.

Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T. & Pandey, R. A. (2010, enero/febrero). *Commercializing lignocellulosic bioethanol: Technology bottlenecks and possible remedies.* Biofuels Bioproducts and Biorefinering, 4 (1), 77-93. DOI: 10.1002/bbb.188.

Barrera, I., Amezcua-Allieri, M. A., Estipuñan, L., Martínez, T. & Aburto, J. (2016, marzo). *Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses.* Chemical Engineering Research and Design, 170, 91-101. DOI: 10.1016/j.cherd.2015.10.015.

Buitrón, G. & Carvajal, C. (2010, diciembre). *Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time.* Bioresource Technology, 101 (23), 9071-9077. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.127.

Buitrón, G., Kumar, G., Martinez-Arce, A. & Moreno, G. (2014a, 11 de noviembre). *Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H2-SBR+CH4-UASB) using tequila vinasses.* International Journal of Hydrogen Energy, 39 (3), 19249-19255. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.139.

Buitrón, G., Prato-Garcia, D. & Zhang, A. (2014b). *Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor.* Water Science and Technology, 70 (12), 1919-1925. DOI: 10.2166/wst.2014.433.

Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (2015). *Avance de las exportaciones de azúcar 2015.* Consultado en Octubre de 2015.

Cámara Nacional de la Industria del Tequila-CNIT. (2014). *Estadísticas de producción de tequila y consumo de agave*. Recuperado e1 18 de octubre de 2014 de www.tequileros.org.

Chávez-Sifontes, M., Domine, M.E. (2013). *Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial.* Avances en Ciencias e Ingeniería, 4,15-46.

Chi, Z. M., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G. & Yue, L. (2009). *Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases.* Applied Microbiology and Biotechnology, 82 (12), 211–220. DOI: 10.1007/s00253-008-1827-1.

Contreras-Dávila, C. A. (2015). *Producción de hidrógeno en sistemas continuos a partir de hidrolizados enzimáticos de bagazo de Agave tequilana Weber.* Tesis de doctorado no publicada. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatriste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M. & Razo-Flores, E. (2008, enero). *Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives.* Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 7 (1), 27-45. DOI: 10.1007/s11157-007-9122-7.

Dominguez Jose M., Cheng S. Gong, George T. Tsao. (1997). *Production of Xylitol from D-Xylose by Debaryomyces hansenii.* Applied Biochemistry and Biotechnology, 63(1), 117-127.

Dunn, J.B., Johnson, M., Wang, Z., and Wang, M. (2013). *Supply chain sustainability analysis of three biofuels pathways.* Technical report, Argonne National Laboratory.

Espinoza-Escalante, F., Pelayo-Ortiz, C., Gutiérrez-Pulido, H., González-Álvarez, V., Alcaraz-González, V. & Bories, A. (2008, septiembre). *Multiple response optimization analysis for pretreatments of Tequila's stillages for VFAs and hydrogen production.* Bioresource Technology, 99 (13), 5822-5829. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.008.

Espinoza-Escalante, F., Pelayo-Ortiz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A. & Gutiérrez-Pulido, H. (2009, enero). *Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane.* Biomass & Bioenergy, 33 (1), 14-20. DOI: 10.1016/j.biombioe.2008.04.006.

European Parliament. (2009). *Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council.* Official Journal of the European Union.

Flores, J. A., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E. J., Arellano, M. & Arrison, J. (2013, octubre). *Simultaneous saccharification and fermentation of Agave tequilana fructans by Kluyveromyces marxianus yeasts for bioethanol and tequila product.* Bioresource Technology, 146, 267-273. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.078.

García-Dueñas, D. A. (1991). *Estudio comparativo de la disminución de la carga orgánica de vinazas tequileras en dos tipos de reactores anaerobios.* Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.

Global Bioenergy Partnership-GBEP. (2011, diciembre). *The Global Bioenergy Partnership Sustainability Indicators for Bioenergy (Primera edición).* Roma Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 7 de octubre de 2014 de http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/Indicators/The_GBEP_Sustainability_Indicators_for_Bioenergy_FINAL.pdf.

Hernández-Salas, J. M., Villa-Ramírez, M. S., Veloz-Rendón, J. S., Rivera-Hernández, K. N., González-César, R. A., Plascencia-Espinosa, M. A. & Trejo-Estrada, S. R. (2009, febrero). *Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse.* Bioresource Technology, 100 (3), 1238-1245. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.062.

Hongjia, L., Foston, M.B., Kumar, R.S., Xiadi, G., Fan, H., Ragauskas, A.J., and Wyman, C.E. (2012). *Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fastgrowing, drought-tolerant biofuels feedstock.* RSC Advances, 2, 4951-4958. DOI: 10.1039/C2RA20557B.

Hubbell, C. A. & Ragauskas, A. J. (2010). *Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization.* Bioresource Technology, 101 (19), 7410-7415. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.029.

Huerta-Alcocer, S. A., Larralde-Corona, C. P. & Narváez-Zapata, J. A. (2014). *Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas.* Bio Ciencias, 3 (1), 3-15. DOI: 10.15741/revbio.03.01.02.

Huitron, C., Perez, R., Sanchez, A. E., Lappe, P. & Rocha-Zavaleta, L. (2008). *Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes.* Journal of Enviromental Biology, 29 (1), 37-41.

Hyun Ah Kang, Jeong-Yoon Kim, Su-Min Ko, Cheon Seok Park, Dewey D. Y. Ryu, Jung-Hoon Sohn, Eui-Sung Choi & Sang-Ki Rhee. (1998). *Cloning and characterization of the Hansenula polymorpha homologue of the Saccharomyces cerevisiae PMR1 gene*. Yeast, 14, 1233–1240. DOI: 10.1002/(SICI)10970061(19980930)14:13<1233::AIDYEA322>3.0.CO;Y.

Ilangovan, K., Linerio, J., Álvarez, E., Briones, M. & Noyola, A. (1996). *Tratamiento anaerobio de vinazas tequileras.* En K. Ilangovan & R. Briones (Eds.), *Biodegradación de compuestos orgánicos* (pp. 42-44). México: Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Ingeniería.

Íñiguez, G., Acosta, N., Martínez, L., Parra, J. & González, O. (2005). *Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras.* Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 17 (1), 37-50.

Íñiguez, G., Flores, S. & Martínez, L. (2003). *Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 5. Biodegradación del material de descarne de la industria de curtiduría.* Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 19 (2), 83-91.

Íñiguez-Covarrubias, G., Díaz-Teres, R., Sanjuan-Dueñas, R., Anzaldo-Hernández, J. & Rowell, R. M. (2001). *Utilization of by-products fron the tequila industry. Part 2: Potential value os Agave tequilana Weber azul leaves.* Bioresource Technology, 77 (2), 101-108.

International Energy Agency-IEA. (2011). *Technology roadmap.* Biofuels for transport. París, Francia: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos/ Autor. Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/biofuels_roadmap_web.pdf.

Ishizaka, A. & Nemery, P. (2013). *Multi-criteria decision analysis: Methods and software*. Chichester, West Sussex, Inglaterra: Wiley.

Jáuregui-Jáuregui, J. A., Méndez-Acosta, H. O., González-Álvarez, V., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V. & Godon, J. J. (2014, septiembre). *Anaerobic treatment of tequila vinasses under seasonal operating conditions: Start-up, normal operation and restart-up after a long stop and starvation period.* Bioresource Technology, 168, 33-40. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.006.

Kalia, S. & Vashistha, S. (2012, marzo). *Surface modification of sisal fibers (Agave sisalana) using bacterial cellulase and methyl methacrylate.* Journal of Polymers and the Environment, 20 (1), 142-151. DOI: 10.1007/s10924-011-0363-8.

Kaltschmitt, M., Reinhardt, G. A. & Stelzer, T. (1997). *Life cycle analysis of biofuels under different environmental aspects.* Biomass and Bioenergy, 12 (2), 121-134. DOI: 10.1016/S0961-9534(96)00071-2.

Kamm, B., Gruber, P. R. & Kamm, M. (2010). *Biorefineries-industrial processes and products: Status quo and future directions.* Weinheim, Inglaterra: Wiley-VCH.

Lane, J. (2014a, 3 de septiembre). *POET-DSM's Project LIBERTY opens, as fantasy becomes real.* Biofuels Digest. Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/09/03/poet-dsms-cellulosic-biofuels-plant-opens-as-fantasy-becomes-real/

Lane, J. (2014b, 17 de diciembre). *Raizen, Iogen commence cellulosic ethanol production in Brazil.* Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/12/17/raizen-iogen-commence-cellulosic-ethanol-production-in-brazil/

Larson, E. (2006, junio). *A review of life-cycle analysis studies on liquid biofuel systems for the transport sector.* Energy for Sustainable Development, 10 (2), 109-126. DOI: 10.1016/S0973-0826(08)60536-0.

Linerio, J. E. (2002). *Selección y evaluación de un sistema de tratamiento terciario para la depuración de vinazas tequileras.* Informe técnico. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema de Investigación Regional José María Morelos.

López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E. & Gallardo-Valdez, J. (2010, junio). *Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes.* Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 9 (2), 109-116. DOI: 10.1007/s11157-010-9204-9.

López-López, A., León-Becerril, E., Rosales-Contreras, M. E. & Villegas-García, E. (2015). *Influence of alkalinity and VFAs on the performance of an UASB reactor with recirculation for the treatment of Tequila vinasses.* Environmental Technology, 36 (19), 2468-2476. DOI: 10.1080/09593330.2015.1034790.

Lozano-Pinedo, E. (1990). *Tratamiento anaerobio de vinazas tequileras en un reactor empacado.* Tesis de licenciatura no publicada. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2408/Lozano_Pinedo_Enedina.pdf?sequence=1.

Marino-Marmolejo, E. N., Corbalá-Robles, L., Cortez-Aguilar, R. C., Contreras-Ramos, S. M., Bolaños-Rosales, R. E. & Davila-Vazquez, G. (2015). *Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with Clostridium predominance.* SpringerPlus, 4, 419. DOI: 10.1186/s40064-015-1193-2.

Martinez-Hernandez, E., Campbell, G. & Sadhukhan, J. (2013, agosto). *Economic value and environmental impact (EVEI) analysis of biorefinery systems.* Chemical Engineering Research and Design, 91 (8), 1418-1426. DOI: 10.1016/j.cherd.2013.02.025.

McCue, D. (2013, 14 de noviembre). *Commercial-scale bio-ethanol plant celebrated in Italy.* Biofuels. Recuperado el 18 de octubre de 2014 de http://www.energias-renovables.com/articulo/commercialscale-bioethanol-plant-celebrated-in-italy-20131114.

Méndez-Acosta, H. O., García-Sandoval, J. P., González-Álvarez, V., Alcaraz-González, V. & Jáuregui-Jáuregui, J. A. (2011, septiembre). *Regulation of the organic pollution level in anaerobic digesters by using off-line COD measurements.* Bioresource Technology, 102 (17), 7666-7672. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.053.

Menon, V. & Rao, M. (2012, agosto). *Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept.* Progess in Energy and Combustion Science, 38 (4), 522-550. DOI: 10.1016/j.pecs.2012.02.002.

Miniutti, P. & Klue, R. (1998). *Theory visualized: Technologically enhanced classroom presentation.* Architronic, 7 (1).

Misra, S., Raghuwanshi, S. & Saxen, R.K. (2012). *Fermentation behavior of an osmotolerant yeast D. hansenii for Xylitol production.* Biotechnology Progress, 28(6), 1457–1465. DOI: 10.1002/btpr.1630.

Montes-Moncivais, A., Moreno, G. & Buitrón, G. (2008, 9-11 de abril). *Biological hydrogen production from tequila industry wastewater (YWP-012).* 1st IWA Mexico National Young Water Professionals Conference. Ciudad de México, México, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Moran-Salazar, R. G., Marino-Marmolejo, E. N., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G. & Contreras-Ramos, S. M. (2016). *Use of agave bagasse for production of an organic fertilizer by pretreatment with Bjerkandera adusta and vermicomposting with Eisenia fetida.* Environmental Technology, 37 (10), 1220-1231. DOI: 10.1080/09593330.2015.1108368.

Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G. & Buitrón, G. (2015). *Biohydrogen production from industrial wastewaters.* Water Science and Technology, 71 (1), 105-110. DOI: 10.2166/wst.2014.471.

Mutemi-Muthangya, A., Mshandete, A. M., Hashim, S. O., Amana, M. J. & Kivaisi, A. K. (2013). *Evaluation of enzymatic activity during vegetative growth and fruiting of Pleurotus HK 37 on Agave sisalana saline solid waste.* Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, 4 (1), 247-258.

Poudelet, V., Chayer, J. A., Margni, M., Pellerin, R. & Samson, R. (2012, septiembre). *A process-based approach to operationalize life cycle assessment through the development on eco-design decisión-support system.* Journal of Cleaner Production, 33, 192-201. DOI: 10.1016/j.jclepro.2012.04.005.

Renewable Fuels Association-RFA. (2013). *Word fuel etanol production.* Industry Statistics. Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996531-cff653b6-7b01.

Sacramento-Rivero, J. C. (2012, enero/febrero). *A methodology for evaluating the sustainability of biorefineries: Framework and indicators.* Biofuels, Bioproducts and Biorefinering, 6 (1), 32-44. DOI: 10.1002/bbb.335.

Saddler, J. N. & Gregg, D. J. (1998). *Forest products biotechnology.* Londres, Inglaterra: Taylor & Francis.

Sadhukhan, J., Ng, K. S. & Martinez-Hernandez, E. (2014). *Biorefineries and chemical processes: Design, integration and sustainability analysis.* Chichester, West Sussex, Inglaterra: Wiley.

Sanchez, A. & Gomez, D. (2014a, 15 de agosto). *Analysis of historical total production costs of cellulosic ethanol and forecasting for the 2020-decade.* Fuel, 130, 100-104. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.04.037.

Sanchez, A., Magaña, G., Gomez, D., Solís, M. & Banares-Alcantara, R. (2014b, septiembre/octubre). *Bidimensional sustainability analysis of lignocellulosic ethanol production processes. Method and case study.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 8 (5), 670-685. DOI: 10.1002/bbb.1512.

Sanchez, A., Magaña, G., Partida, M. I. & Sanchez, S. (2016, marzo). *Bi-dimensional sustainability analysis of a multi-feed biorefinery design for biofuels co-production from lignocellulosic residues and agro-industrial wastes.* Chemical Engineering Research and Design, 107, 195-217. DOI: 10.1016/j.cherd.2015.10.041.

Sanchez, A., Sevilla-Güitrón, V., Gutiérrez, L. & Magaña, G. (2013). *Parametric analysis of 2G enzymatic ethanol production costs and energy efficiency in medium-scale agriculture sectors.* Fuel, 113, 165-179.

Sen, B. & Chandra, T. S. (2007, mayo). *Chemolytic and solid-state spectroscopic evaluation of organic matter transformation during vermicomposting of sugar industry wastes.* Bioresource Technology, 98 (8), 1680-1683. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.06.007.

Singh, P. K. R Kumar, K. Schugerl. (1992). *Byconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 45, 29-55. DOI: 10.1007/BFb0008755.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (2009). *Producción anual de cultivos.* Consultado Octubre 2015.

Sparg, S.G., Light, M.E. & Staden, J. (2004). *Biological activities and distribution of plant saponins.* Journal of Ethnopharmacology, 94(1-3), 219-243. DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.016.

Stephen, J. D., Mabee, W. E. & Saddler, J. N. (2011, marzo/abril). *Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 6 (2), 159-176. DOI: 10.1002/bbb.331.

Suryadi Herman, Tohoru Katsuragi, Nobuyuki Yoshida, Shinsuke Suzuki, Yoshiki Tani. 2000. *Polyol production by culture of methanol-utilizing yeast.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 89(3), 236–240. DOI:10.1016/S1389-1723(00)88825-8.

Tahir, A. C. & Darton, R. C. (2010, noviembre). *The process analysis method of selecting indicators to quantify the sustainability performance of a business operation.* Journal of Cleaner Production, 18 (16-17), 1598-1607. DOI: 10.1016/j.jclepro.2010.07.012.

Talebnia, F., Karakashev, D. & Angelidaki, I. (2010, julio). *Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.* Bioresource Technology, 101 (13), 4744-4753. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.080.

Tanaka, N. (2011). *Biofuels for Transport.* International Energy Agency.

United States Department of Energy–US-DOE. (2015, febrero). *Lignocellulosic biomass for advanced biofuels and bioproducts.* Workshop Report, DOE/SC-0170. Recuperado el 7 de octubre de 2015 de http://genomicscience.energy.gov/biofuels/lignocellulose/BioenergyReport-February-20-2015LR.pdf.

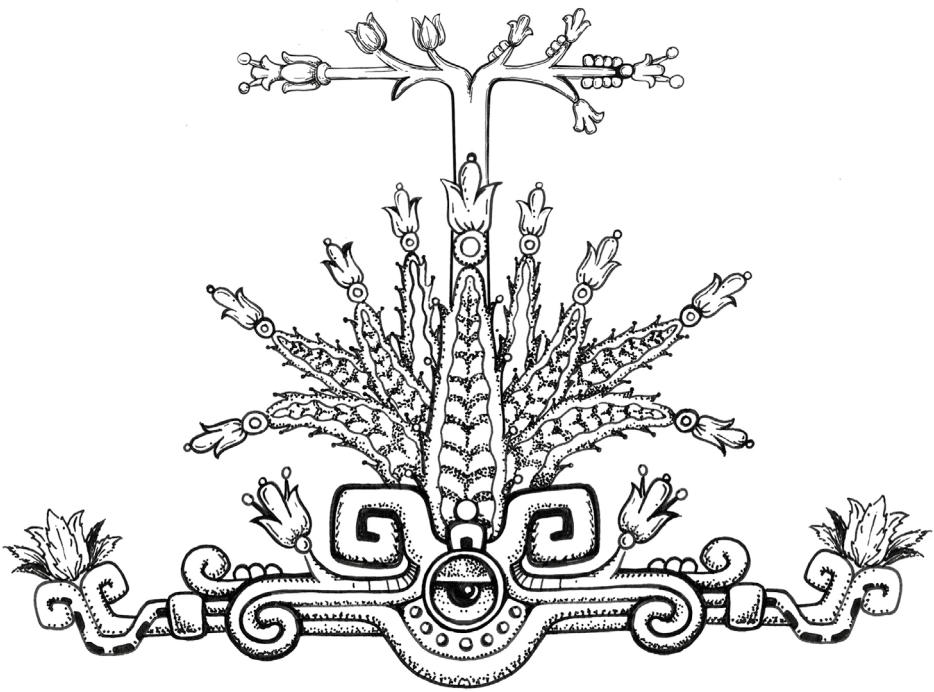
United States Environmental Protection Agency–US-EPA. (2010, febrero). *Renewable fuel standard program (RFS2) Regulatory impact analysis*. Recuperado el 21 de septiembre de 2014 de https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/420r10006.pdf.

Voellger, Z. (2000). *Determinación de la cinética de una digestión anaerobia de vinaza*

tequilera en un reactor de lecho fluidizado. Tesis de licenciatura no publicada. Universidad de Guadalajara-Instituto de Química, Guadalajara, Jalisco, México.

Zamora, P.C., Juárez, F.B.I., Aguirre, R.J.R., Ortiz, P.D., Godínez, H.C.I. & Alvarez, F.G. (2010). *Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero potosino*. e-Gnosis, 8,1-11.

5. PERSPECTIVAS SOCIALES, HISTÓRICAS Y ECONÓMICAS DEL AGAVE EN MÉXICO: UNA MIRADA A SUS PROBLEMÁTICAS, PRODUCCIÓN, APROVECHAMIENTO Y CONSUMO



PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO
Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves

Vázquez-Elorza, A., Sánchez-Osorio, E., Pérez-Ramírez, M., Contreras-Medina, D., Pardo-Núñez, J., Figueroa-Galván, N., Gallardo-Valdez, J.

RESUMEN

El agave es una planta conocida a nivel internacional principalmente por una de las bebidas de origen mexicano: el tequila. "Una de las asociaciones que más éxito tuvo (*con este elixir*) fue la que se produjo con el hidalgo campirano, es decir, con el charro, cuya imagen quedó idealizada entre un pasado mítico y una ruralidad bucólica, así como con el mariachi, otro símbolo nacional realzado en este momento" (Alfaro citado en Suárez, 2012, p. 64). Bien es sabido, además, que se pueden elaborar otros tipos de bebidas espirituosas como el pulque y el mezcal, entre las principales.

En el presente capítulo se abre, en primer lugar, un horizonte histórico de la relación social con el agave, los vínculos con tradiciones y costumbres que muestran cómo el género humano, desde hace mucho tiempo tiene un vínculo con la planta; en un segundo momento, se habla de las problemáticas socioeconómicas que se han venido desarrollando en el sector agave-mezcal, posteriormente, se muestran las características de la producción actual en México. Son cinco los estados de la República que acaparan la mayor producción de agave: Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, Michoacán y Guerrero. Así mismo se muestra cómo se ha desarrollado la industria de la producción en México y nos abre un panorama general sobre las exportaciones a diferentes países como Corea del Sur, Brasil, Alemania, España, entre otros. El cuarto apartado del texto nos muestra, desde una mirada social y política, las tensiones en el campo agavero, a la vez que explora las principales problemáticas en los arrendamientos por contrato, el papel de los intermediarios (comúnmente conocidos como *"coyotes"*) en el cultivo del agave, la función del Estado y los programas destinados al campo rural; esta sección culmina con una revisión sobre el tema de la Denominación de Origen de estas bebidas.

En el segmento titulado "*El agave y su uso en la ciencia y la tecnología*" se demuestra la importancia no sólo de la producción de bebidas alcohólicas a partir de la piña del agave, sino también de nuevas tecnologías que aprovechan los desechos de la planta al ser reutilizados. Hay descubrimientos de los beneficios que tienen los fructanos del agave para personas con problemas de diabetes y colesterol, así como para personas con obesidad, entre otros. Hallazgos de materiales como bioplásticos y finalmente, investigaciones que contribuyen a la mejora de la producción y cuidado de la planta.

Aborda a su vez las problemáticas en la cadena de valor del agave, las perspectivas y retos del sector relacionados con la diversidad y Denominación de Origen Mezcal. Lo que implica establecer estrategias de comercialización e implementación de políticas para estandarizar la calidad del mismo. En la última seccion de este capítulo se expone el panorama de las problemáticas actuales relativas a la cadena de producción del agave en México. En ella se advierte de los diferentes planes y programas que se han desarrollado para enfrentarlas. Se plantea además, que el ciclo en la cadena de valor del agave está llegando al final de su era tradicional y entrando al momento de su industrialización.

Finalmente, la temática sobre los impactos ambientales de la producción de mezcal es abordada, considerando la necesidad de establecer mecanismos para la conservación de la biodiversidad. El incremento de la demanda nacional e internacional del mezcal implica cambios en los procesos y valorización de la planta teniendo como resultados importantes movimientos socioproductivos.

En definitiva el objetivo general del texto es ofrecer una mirada interdisciplinaria (de corte social, político y económico) sobre las principales problemáticas que existen actualmente en el campo de agave-mezcal. Este primer acercamiento proviene de una amplia revisión bibliográfica actualizada, así como de la necesidad de atender desde otras perspectivas las relaciones y necesidades del sector y que actualmente se encuentran en construcción.

Palabras clave: *Agave-mezcal, producción, Denominacion de Origen, biodiversidad.*

5.1 INTRODUCCIÓN

La problemática socioeconómica derivada de los diferentes usos y aprovechamientos que se hacen actualmente de las diversas especies de *Agave* en el territorio del país, es compleja y aparentemente poco importante, por lo tanto es ignorada o mínimamente considerada. En este contexto, son pocos los estudios etnobotánicos en los que se aborda la parte histórica: los usos, tradiciones y costumbres, la organización social de las comunidades rurales, la creación de paisajes culturales como resultado de la humanización del espacio, así como los impactos sociales que de ello derivan, al igual que, aspectos como la pérdida de biodiversidad, sobrexplotación de especies, agotamiento de los recursos filogenéticos, omisión de la regulación, entre otros, cuyo impacto económico y ambiental implican transformaciones importantes en los ecosistemas, y que han sido ignorados.

La creciente demanda de materia prima para abastecer el sector de las bebidas alcohólicas derivadas de agave, particularmente las industrializadas, ha generado la sobreexplotación de las especies de agaves silvestres teniendo graves afectaciones a los ecosistemas. De la misma forma, las especies domesticadas son el blanco de plagas y enfermedades que merman considerablemente los cultivos.

La creciente demanda de materia prima para abastecer el sector de las bebidas alcohólicas, [...] ha generado la sobreexplotación de las especies de agaves silvestres

Gracias a la organización de los productores bajo el esquema sistema-producto, se ha logrado consolidar como una política gubernamental a través de la cual algunas dependencias oficiales (Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Pesca y Alimentación [SAGARPA], Comisión Nacional Forestal [CONAFOR], secretarías estatales de Desarrollo Rural o Agropecuario), lo promueven como una estrategia para arraigar a la población en sus comunidades y como un cultivo alternativo del que pueden obtener ingresos con el objetivo de mejorar sus condiciones de vida. Sin embargo, la realidad es totalmente opuesta, los pequeños productores que conforman la gran mayoría del sector son los menos beneficiados con estos apoyos, ya que se diluyen a lo largo de la cadena y sólo funciona para la obtención de apoyos condicionados, no obstante, los aspectos sociales ante una economía globalizada los relega a un modo de vida de subsistencia, aunado a ello, la poca o nula organización los exime de capacitación y acceso a paquetes tecnológicos.

Sabido es que desde tiempos ancestrales, el maguey o agave significó una fuente de aprovisionamiento de recursos muy importante para las sociedades precolombinas (Gallardo *et al.,* 2008); de él se obtenían

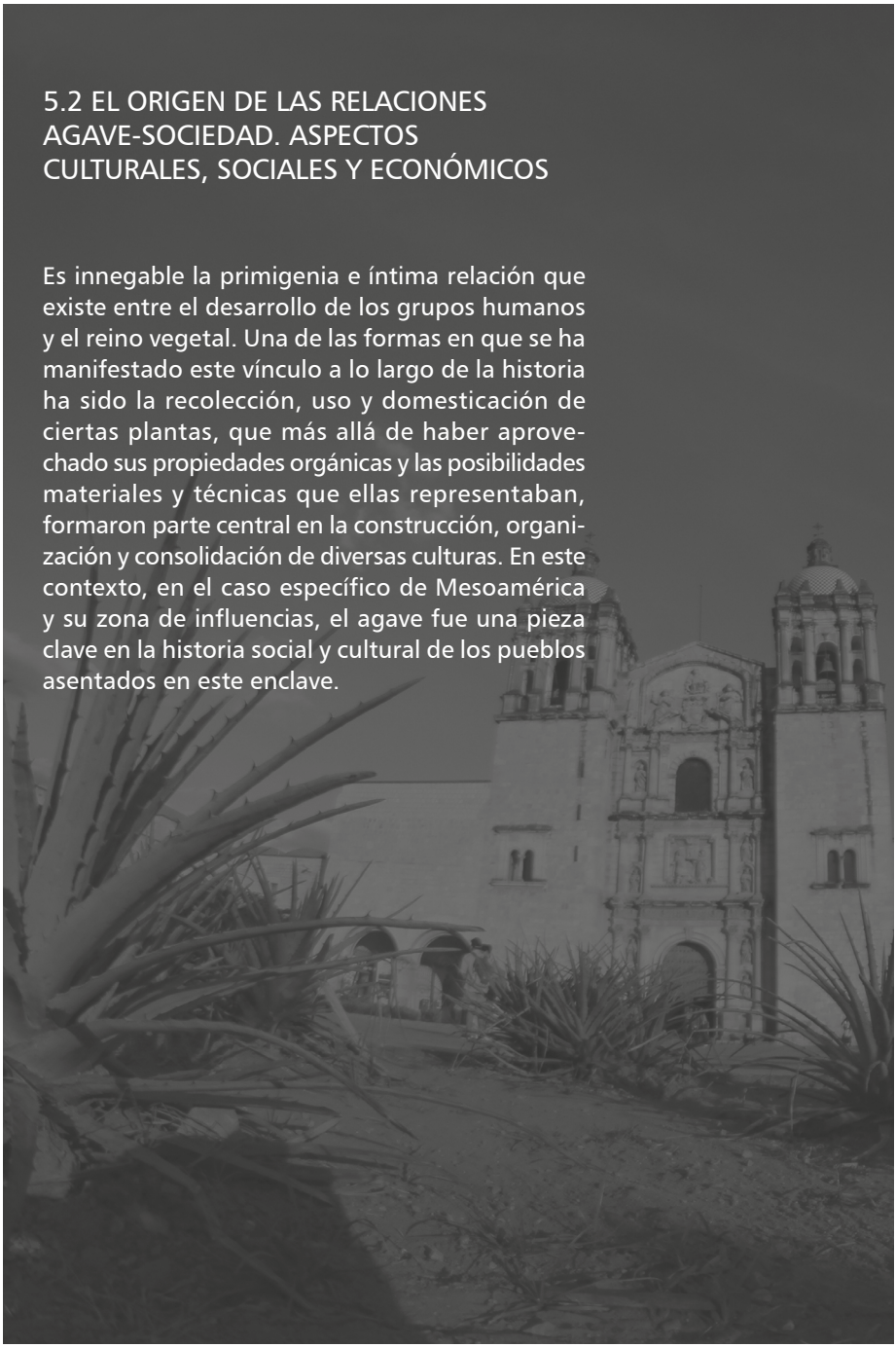
materiales para la elaboración de diversos productos útiles en la vida cotidiana, por lo que la planta fue elevada al rango de deidad por las culturas mesoamericanas. Actualmente el aprovechamiento más difundido del maguey es la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas y fermentadas por lo que constituye la materia prima de una rama importante de la economía: la agroindustria, de la que dependen las cadenas productivas agave-tequila, agave-mezcal y agave-bacanora en el caso de las bebidas con Denominación de Origen, además de otras de carácter regional como la *"raicilla"* de Jalisco o el *"comiteco"* de Chiapas, entre otras.

Respecto de la materia prima, el maguey es considerado como un recurso forestal no maderable y diversos programas sectoriales lo tienen como eje articulador para el desarrollo económico; sin embargo, por su naturaleza, algunas variedades requieren de técnicas especiales para su manejo y propagación, tal es el caso del *A. cupreata*, especie endémica de la cuenca del Balsas que comparten los estados de Puebla, Guerrero y Michoacán, lo que ha generado reducción en las poblaciones silvestres. En el caso de las bebidas alcohólicas destiladas de agave, concretamente del mezcal, el territorio protegido por la figura jurídica de la DOM, es excluyente al dejar fuera a diferentes regiones de algunos estados que históricamente han sido productores de esta bebida, sometiendo a la informalidad a las bebidas producidas en ellos, relegándolos al grado de *"destilados"*.

Así mismo, las especies de *Agave* referidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 representan un obstáculo más, pese al reconocimiento de la existencia de más de 30 variedades de las cuales se obtienen este tipo de bebidas.

5.2 EL ORIGEN DE LAS RELACIONES AGAVE-SOCIEDAD. ASPECTOS CULTURALES, SOCIALES Y ECONÓMICOS

Es innegable la primigenia e íntima relación que existe entre el desarrollo de los grupos humanos y el reino vegetal. Una de las formas en que se ha manifestado este vínculo a lo largo de la historia ha sido la recolección, uso y domesticación de ciertas plantas, que más allá de haber aprovechado sus propiedades orgánicas y las posibilidades materiales y técnicas que ellas representaban, formaron parte central en la construcción, organización y consolidación de diversas culturas. En este contexto, en el caso específico de Mesoamérica y su zona de influencias, el agave fue una pieza clave en la historia social y cultural de los pueblos asentados en este enclave.



Lo anterior adquiere sentido si se considera que el género *Agave* es endémico del continente americano; de acuerdo con García-Mendoza (2007), existen a lo largo de su territorio cerca de 200 especies diseminadas desde Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del caribe. Según varios autores (García-Mendoza, 2007; Villaseñor, 2004), entre 150 y 173 especies de *Agave* se encuentran en México, número que representa al menos el 75% del total de especies actualmente reconocidas.

Existen cerca de 200 especies (de Agave) diseminadas desde Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo todas las islas del caribe

En algunos trabajos se refiere de manera muy general que el uso de la planta fue uno de los principales medios de subsistencia de los grupos mesoamericanos antes de la Conquista. Basados en la recopilación de evidencia arqueológica se hace posible deducir que el maguey se conoció incluso antes que el maíz:

> "*(...) como la muestran los vestigios encontrados en las cuevas de La Perra y La Barranca del Infiernillo, Tamaulipas; en Tehuacán, Puebla; cuevas del Riego, Abejas, Purrón y Coxcatlán, Guilá, Naquitz, Piedra Blanca y Roca Martínez de Oaxaca y la Cuenca de México (...) La utilización del maguey efectuada por grupos nómadas de la Sierra de Tamaulipas, han quedado demostrados por análisis recientes que han indicado un uso que va del 50% al 70% en alimentos por vegetales entre los que se encuentran el maguey que se comió asado y cuya técnica aún primitiva se requería de artefactos, tales como tajadores bifaciales de piedra local" (Rivas y Lechuga citados en Sierra, 2005, p.42).*

Asimismo, José Hernández y Elizabeth Hernández (2012), nos proporcionan más datos que reafirman la antigüedad e importancia de la explotación del agave en la región:

> "*De acuerdo con las investigaciones de Flannery en Oaxaca, la relación entre los grupos humanos y estas plantas, iniciada con fines alimenticios y para la obtención de fibras, data de al menos hace diez mil quinientos años. Dos mil años antes de la domesticación del maíz o del desarrollo de la agricultura, la principal fuente de azúcares y carbohidratos era el mezcal. Después se le añadirían el maíz, el frijol y la calabaza, los cuales gradualmente*

1. Mientras que García-Mendoza señala la presencia de 150-159 especies de *Agave* en territorio mexicano, Villaseñor afirma que son 173.

irían desplazando a aquel de su peso específico en la dieta, relegándolo a los tiempos de escasez" (p.19).

Quizá uno de los casos más icónicos y mejor documentados sea la relación que mantuvieron los pueblos del centro de México con el agave. Patricia Sierra (2005) menciona que dentro de la cultura náhuatl, en especial al interior del pueblo mexica, se hacía alusión al agave o maguey con la palabra "*metl*". Como ejemplo de la relevancia que tenía la planta al interior de estos grupos se encuentran las crónicas hechas por Sahagún, en las que se menciona que:

> "*Este nombre mexicatl, se decía antiguamente mecitli, componiéndose de me que es metl por el maguey y de citli por la liebre, y así se debía decir mecicatl; y mudándose la c en x corrómpese y dícese mexícatl. Y la causa del nombre según lo cuentan los viejos es que cuando vinieron los mexicanos a estas partes traian un caudillo y señor que se llamaba Mécitl, al cual luego después que nació le llamaron citli - "liebre"; y porque en lugar de cuna lo criaron en una penca grande de un maguey, de allí adelante llámose mecitli*" (citado en Sierra, 2005).

Aunado a esto, existió un desarrollo material y técnico en Mesoamérica posibilitado por la explotación del agave, que iba desde su utilización como alimento e importante fuente de material textil, hasta su aprovechamiento médico o como material de construcción. En las "*Relaciones Geográficas de la Diócesis de México. Manuscritos de la Real Academia de la Historia de Madrid y del Archivo de Indias en Sevilla. Años 1579-1582*", obra citada por Sierra (2005), se pueden encontrar descripciones detalladas de los diversos productos y usos del agave que los españoles encontraron a su llegada a la región, y que posiblemente ellos mismos fueron adaptando a su cotidianidad. En dichos documentos se constata cómo el agave proveía los materiales necesarios para sustentar la vida de los pobladores de la región:

> "*Y como era poca la tierra que sembraban y no bastava sustentalles su año, se sustentan con aguamiel que sacan de los magueyes... este aguamiel es medicina, purgativa, y aun los españoles la tienen por de mucha sustancia... y de sus pencas, que son grandes y gruesas, hazen ylo, y del ylo mantas y zapatos, y de las puntas de dichas pencas, agujas gruesas. Son así mismo las dichas pencas muy buenas de comer, cozidas en orno ... de las rrayzes y hojas del maguey hazen vn género de comida muy dulce que llaman meyscal... hazen nequen que es como cañamo, del que hazen rropa para su vestirse como anejo, cuerdas, sogas y otras jarcias; las hojas entre los naturales sirven de tablas, canales, leña para quemar; el cogollo de este árbol, asados, con el sumo curan heridas y otras llagas y cualquier quebradura*" (Del Paso y Troncoso citado en Sierra, 2005, p. 26).

En 1864 Manuel Payno, en su libro "*Memoria Sobre el Maguey Mexicano y sus Diversos Productos*", arroja ciertas pistas

acerca de la palabra maguey, afirmando que ésta no es de origen mesoamericano, sino que es posible que provenga desde "las islas (caribeñas) donde los naturales probablemente daban ese nombre a los aloes" (p.13). El autor revela que fue con el nombre de maguey que Lineo conoció la planta para posteriormente diferenciarla de otras con el nombre de *"Agave"*.

> "*Cuando llegó la planta del maguey al conocimiento del sabio naturalista Lineo, seguramente tuvo noticias muy exactas de todas las singulares propiedades de la planta, la distinguió de los aloes, y al formar una tribu pequeña, pero separada, y ponerle el nombre hizo su completo elogio. La llamó Agave del griego αγαυή, que quiere decir magnifica, admirable*" (p. 13).

En la actualidad, desde las zonas semidesérticas del norte del país hasta la península de Yucatán, es posible encontrar diversas técnicas de explotación del agave, con un origen claramente prehispánico, que han sido adecuadas a las particularidades de cada región en donde se llevan a cabo. Tenemos por ejemplo algunos estados del centro del país como Hidalgo, San Luis Potosí y partes de Zacatecas, donde los campesinos aún cosechan las hojas laterales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) para poder extraer el ixtle, que a nivel nacional es utilizado como materia prima para fabricar cuerdas, estropajos, brochas, costales, morrales, entre muchos otros productos.

Sin embargo, ésta no es la única zona en la que se consiguen fibras a partir de algún tipo de agave, la Península de Yucatán se distingue de sobre manera por la producción de fibras a partir del henequén (*Agave fourcroydes*), de las cuales se puede sacar infinidad de provecho. Esta planta representó toda una industria por sí sola ya desde el siglo XIX, como da cuenta Manuel Payno en 1864:

> "*(…) en Yucatán la industria del jenequen se halla establecida en larga escala: se reduce a despojar de hojas de la parte verde y carnosa, y á lavar y secar después al sol las fibras, para que queden limpias y blancas. A esto llaman por el valle de México "ixtli" y en Yucatán "sosquil". De este sosquil, tejen hamacas, costales, aparejos, etc. pero además se emplea en jarcia para los buques, la cual es preferible á la de cáñamo por su flexibilidad*" (p.111).

A la fecha, dicha industria sigue actualizándose y mejorando los procesos de producción, además de diversificar sus usos con miras a competir en el mercado internacional de las fibras, llegando a terrenos tan diversos como la industria automotriz y la de la construcción (Cruz-Ramos, 2010).

Por otra parte, hablar de los usos y productos que del agave se obtienen, merecería un trato especial pues, como se ha expuesto, hay un sin fin de ellos, cada uno con cualidades propias y únicas frente

2. Esto puede ser corroborado en Sierra (2005) respecto del uso de la palabra "*metl*" en el territorio mesoamericano.

a los otros; esto depende no sólo de la determinada variedad de planta que crece en cada territorio, sino también de las necesidades de orden simbólico y social de los grupos que los elaboran. Sin embargo, para los fines que nos convocan, se hará mención únicamente de algunos de ellos a modo de ilustración.

Entre los productos tradicionales del agave que hoy en día se pueden encontrar el aguamiel, que surge de la piña del maguey, y con el que se pueden preparar desde atoles, jarabes y vinagre, hasta miel, obtenida mediante procesos de evaporación. Además de lo anterior, hay infinidad de remedios que son elaborados a parir de esta salvia, con el fin de tratar diversos padecimientos y enfermedades. En algunas regiones semidesérticas de Hidalgo, San Luis Potosí y Zacatecas es consumida cotidianamente a manera de bebida refrescante.

En el campo culinario es posible encontrar los gusanos de maguey (Agave salmiana) conocidos popularmente como chinicuil, tecol o gusano rojo

En el campo culinario es posible encontrar productos como los gusanos de maguey conocidos popularmente como *"chinicuil"*, *"tecol"* o *"gusano rojo"*, que se alimenta de diferentes partes de la planta. Según Castro-Diaz y Guerrero-Beltrán (2013) dicho gusano es una larva de la palomilla *Comadia redtenbacheri* Hammerschmidt; contiene siete aminoácidos esenciales y un valor energético de 607.9 kcal/100 g, uno de los más elevados para insectos comestibles. Su consumo se da principalmente en el Altiplano central (Oaxaca, San Luis Potosí y Chiapas). A su vez, el llamado *"gusano blanco de maguey"* (*Acentrocneme hesperiaris*) también es un insecto de importante valor alimenticio; los estados en los cuales se consume comúnmente esta variedad son Aguascalientes, Durango, Estado de México, Puebla, Tlaxcala y Zacatecas (Castro-Diaz y Guerrero-Beltrán, 2013).

También la cutícula desprendida de las pencas de algunas variedades de maguey es empleada a modo de envoltorio, conocido como *"mixiote"*, para diversos guisos; es utilizada con el objetivo de proporcionar un sabor especial a la carne que los acompaña, y es un tradicional recurso culinario muy popular en la zona este de México. Otro de los usos que tienen las pencas de maguey está ligado a la construcción, puesto que tradicionalmente se echó mano de ellas para techar las casas a modo de tejado, ya sea para construcciones con fines habitacionales o cobertizos destinados para el ganado y demás animales domésticos (Alanís-Flores y González-Álvarez, 2011).

Sin duda alguna, los productos de agave con mayor relevancia nacional e internacional, son las bebidas alcohólicas que se elaboran con sus jugos, ya sea a partir de su fermentación o su destilación. El pulque

es una bebida producto de la fermentación de la salvia o aguamiel de ciertas especies de *Agave* (*A. mapisaga, A. salmiana*, etc.), las cuales generalmente crecen en las regiones este, centro-sur, centro-norte y suroeste de México. Esta bebida tiene una larga historia bien documentada, siendo considerada en tiempos prehispánicos como sagrada por diversas culturas al interior de Mesoamérica y regiones aledañas; tanto así, que era un elemento fundamental en los mitos y ritos que otorgaban sentido y continuidad a dichas culturas (Sierra, 2005). Desde su presencia en restos arqueológicos, pasando por las crónicas y leyendas durante el Virreinato, hasta la consolidación de un gran mercado e industria nacional en los siglos XIX y la mitad del XX, comprueban que el pulque ha sido a lo largo del tiempo un elemento nodal en la configuración de la vida social de México (Lazcano-Arce, 2011; Lorenzo-Monterrubio, 2007; Ramírez-Rodriguez, 2007; Payno, 1864).

De igual manera, García-Mendoza (2012) afirma que hoy en día se pueden distinguir por lo menos tres grandes significados del término *"mezcal"*. El primero es otorgado en el norte de la República a algunas especies de *Agave*; un segundo significado refiere a la bebida destilada que se elabora con sus jugos fermentados, y por último, está aquel que sirve para denominar al alimento obtenido de la cocción del tallo y base de las pencas u hojas. Lo anterior resulta una prueba más de la estrecha relación entre las experiencias de vida de las distintas culturas en relación con el agave, así como del conocimiento de su producción, vínculo que permite la emergencia de un horizonte técnico demasiado amplio. Tal complejidad es sintetizada en este caso, en las múltiples formas de destilación del agave, las cuales son tan variadas como los territorios y las tradiciones que se han desarrollado a partir de su uso a lo largo de la historia.

Actualmente, la producción de destilados de agave está presente en más de 20 estados de la República Mexicana, lo cual es posible gracias a la explotación de las distintas variedades de la planta, muchas de las cuales son endémicas (García-Mendoza, 2012). La denominación de la bebida, su calidad, así como su consumo en la vida cotidiana, rituales o festividades, están en estrecha relación con la región donde se procesan.

Así, es posible distinguir el "*bacanora*" de Sonora, o el "*vino mezcal*" en la sierra de San Carlos, Tamaulipas, sin olvidar el representativo "*tequila*" de Jalisco. También se debe mencionar la especialización en la variedad de estilos de destilación que hay en el estado de Oaxaca, en las que se emplean más de 8 especies distintas y 17 formas protegidas o silvestres de *Agave* (García-Mendoza, 2012), cada una de ellas con un nombre propio que define también la manera en que se reliza su destilación. Regiones de San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Coahuila, Chihuahua, Nayarit, Guerrero y Guanajuato también cuentan con una tradición mezcalera de siglos. La destilación del agave está presente incluso en estados como Chiapas, con su destilado "*comiteco*"; igual que en Yucatán, donde a pesar de que se afirma que no se producían bebidas destiladas del henequén,

en la actualidad se ha desarrollado un mercado de mezcal y licor de este agave (García-Mendoza, 2012; Lazcano, 2011; Serra y Lazcano, 2009).

A partir de recientes investigaciones etnoarqueológicas realizadas en los estados de Tlaxcala (Lazcano, 2011; Serra y Lazcano, 2009;) y Colima (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2010), se han hallado múltiples evidencias de la presencia de hornos, los cuales se presume fueron utilizados para el cocimiento de cabezas de agave. Dichas evidencias permiten plantear que hubo procesos de destilación de agave en épocas prehispánicas. Todo esto está siendo corroborado a partir de estudios de corte etnográfico en los que se comparan los procesos y técnicas de destilación tradicionales que siguen funcionando hoy en día, buscando relaciones que permitan hallar indicios que respalden dicha teoría.

Lo anterior no solamente demuestra lo profundo, desconocido y amplio de la relación que como mexicanos tenemos con el agave. A pesar de vivir en una era en la que se considera que el contacto y relación con la naturaleza cada vez es menor, el echar una mirada a una planta tan prolija y todo lo que de ella obtenemos y disfrutamos, nos puede demostrar lo equivocada que es esta noción.

Siendo nuestro país el más rico en número de especies de *Agave*, y cuna de sociedades y culturas que adoptaron estas plantas como elemento nodal de su vida práctica y simbólica, no es casualidad que su importancia siga vigente, considerándola un elemento de identidad. Como muestra, la legislación que se ha hecho en algunos estados de la República para la protección de la planta ante la diversidad de formas de explotación que se le da, particularmente en grandes procesos de industrialización sujetos a las dinámicas del mercado actual. En los escenarios rurales así como en las grandes urbes es innegable la presencia del agave, que conforman aspectos básicos de la vida cotidiana de los mexicanos; desde un platillo tradicional servido en la mesa de una festividad patronal, hasta la innovación en materiales para la construcción en los grandes complejos habitacionales, se hace patente un vínculo inacabado que habla de los distintos y diversos trayectos históricos que han configurado la vida social, cultural, económica y tecnológica de nuestro país.

5.3 LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE AGAVE EN MÉXICO

Cultivo de Agave tequilana var. azul, en campo agavero de la destilería "La Alteña." Arandas, Jalisco.

La importancia de la producción y consumo del agave radica, por un lado, en que se encuentran en el país diversas especies localizadas en diferentes regiones (Villaseñor, 2004); por otro lado, a que desde hace muchos años la plantación y producción forma parte de la idiosincrasia, hábitos y cultura de la gente que la produce. De acuerdo con los registros de la SAGARPA, en 2011 existían 460 municipios con plantaciones sembradas de agave (mezcalero, bacanora, tequilero, maguey); sin embargo, en 2014, se redujo a 402 municipios. De este total, por lo menos 175 municipios tienen registros de producción de agave-mezcal, 181 se dedican al cultivo de agave-tequila, y 54 al *Agave tequilana* Weber (Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], SAGARPA, 2016); con ello se preserva la identidad, ecosistema y biodiversidad regional. En el transcurso del desarrollo del mercado y

el incremento de una demanda cada vez más exigente, las unidades de producción han buscado transitar de pequeñas producciones a la especializacion, como medio de control económico, generando una pérdida de valor sobre las tradicionales formas de cultivo en el aprovechamiento (sobreexplotación) del agave.

En la actualidad, el cultivo del agave en México atraviesa por una difícil situación de índole social, económica y agroecológica debido a la falta de políticas públicas focalizadas en revertir los daños que ocasionan los malos manejos en el aprovechamiento sustentable de las variedades de *Agave* para uso agroindustrial y artesanal, atendiendo importantes cantidades de demanda nacional e internacional de tequila y mezcal, principalmente. Además, existe una reducción de la riqueza en la biodiversidad existente entre los ecosistemas observándose una sobre explotación en áreas accesibles en Guerrero (Barrios-Ayala; Ariza-Flores; MolinaMuñoz; Espinosa-Paz y Bravo-Mosqueda, 2006). Aunado a esta situación, el sector productivo rural presenta complejas condiciones de bienestar de los productores.

El agave simboliza una planta con un alto valor comercial para las grandes industrias comercializadoras que no se ve reflejado en las condiciones de vida de los pequeños productores rurales. En lo que se refiere al valor de la producción nacional el agave concentró en 2014 aproximadamente 2.43% respecto del total de todos los productos agrícolas del país. Los estados de Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, Michoacán y Guerrero acumularon 94.38% del total del valor de la producción del país, así como 88.48% del total de la producción nacional de la planta con una superficie ocupada de 107, 246.07 hectáreas sembradas de las 120, 339.51 sembradas en 2014 (SAGARPA, 2015).

El rendimiento promedio del agave (en general) es de 43.81 ton/ha) sobresaliendo el estado de Puebla (con 93.67 t/ha), Zacatecas (84.24 ton/ha), Morelos (61.50 ton/ha) y Jalisco (61 ton/ha). En lo que respecta al agave–mezcal el rendimiento promedio oscila en 37.68 ton/ha, sobresaliendo Puebla (93.67 ton/ha) y Oaxaca (46.86 ton/ha). En cuanto a la generación de trabajo, Casiano (2015)

señala que en unidades de servicio pos eslabón en la cadena productiva de Agave-Mezcal en 2014 se situaban productor de maguey 301, productor de mezcal 494, envasador 230, marcas (comercializador) 362, con un total de mil 387 unidades, lo cual representa una importante industria en el sector agroindustrial.

La distribución geográfica de la planta de agave en México (mezcalero, tequilero, bacanora y maguey) se concentró en 475 municipios (en el año 2011) ubicados en 23 entidades federativas de la República Mexicana, destacando Oaxaca, Jalisco, Michoacán, Zacatecas, Guanajuato, Nayarit y Guerrero principalmente (SAGARPA, 2015). Al comparar los municipios situados en las zonas productoras de agave con aspectos indígenas del país publicados por la Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI) se observa que el 12.63% de los 475 municipios agaveros son indígenas (de este total el 83.33% se dedican al mezcal y el 16.67% al tequila), el 80.63% corresponden a municipios con población indígena dispersa y únicamente el 0.84% no tiene población indígena (CDI, 2015). Cabe destacar que 45 municipios agaveros del país mantenían índices de marginación (IMg) muy alta en 2010 que representaron el 9% a nivel total nacional, 53 municipios se caracterizaron por un IMg alto (11%), 219 con IMg medio (46%), 108 con IMg bajo (23%) y 50 municipios con el IMg muy bajo (11%) (datos obtenidos a partir del Consejo Nacional de Población [CONAPO], 2015; SAGARPA, 2015).

De acuerdo con la información de SAGARPA (2015), en México existían 120,339.51 hectáreas de agave sembradas (registradas en 2014) donde Jalisco sobresale con el 63.31% de la superficie, le sigue Guanajuato (13.01%), Oaxaca (7.14%), Nayarit (4.19%), Michoacán (4.16%), entre otros estados. Del total de la superficie sembrada de agave en el país, 83.62% tiene clasificación de tequilero y está situada en 297 municipios; 16.25% se reportó como mezcalero distribuido en 167 municipios y 0.06% como bacanora, situado en 5 municipios. Existen además 6 municipios que no tienen clasificación sobre el tipo de agave que se cultiva en sus localidades y representan 0.07% de la superficie sembrada (CONAPO, 2010; SAGARPA, 2015).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura (FAO) y Bruinsma (citados en Ibarrola-Rivas, 2010), establecen que los sistemas de producción agrícola en México se han desarrollado en dos vertientes, por un lado, con un tipo de sistema de producción agrícola intensivo que emplea importantes cantidades de energía y agua; por otra parte, el extensivo utilizando grandes cantidades de tierra. Con ello se advierte sobre el deterioro e impacto ambiental que puedan tener las regiones productivas, así como, que la producción mundial de alimentos es la principal causa de la deforestación, la desertificación y la pérdida de biodiversidad. En este contexto las plantaciones de agave no son la excepción; sin embargo, se reconoce la necesidad de preservar la biodiversidad.

El aprovechamiento y uso de los derivados del agave son múltiples y están relacionados con la temporada, zona de producción y variedad de la planta según las latitudes

y regiones del país. Entre las bebidas más importantes que se destilan del agave se encuentran el mezcal, el tequila y el bacanora. Sin embargo, el tequila y el mezcal han sido los subproductos con un distintivo que ubica a México como el centro de origen y principal productor a nivel mundial sobre una base de importancia económica industrial y artesanal.

De acuerdo con las estrategias estatales de innovación en los estados de Guerrero y Oaxaca (CONACYT, 2015) se establece como producto prioritario al mezcal. Éste se produce fundamentalmente en el estado de Oaxaca, que concentra aproximadamente el 80% de la producción total; Guerrero, Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Guanajuato agrupan el 20% restante de la producción de la bebida (Consorcio de productores artesanales BINNIZA, 2014). La alta proporción de población dedicada a la producción artesanal e industrial del mezcal en situación de pobreza, lo convierte en un detonador de combate a la pobreza y mejora la calidad de vida de la población en los municipios productores.

Por otro lado, según el Consejo Regulador del Tequila (CRT, 2015), la producción (en volumen expresado a 40% de alcohol) del tequila 100% agave se incrementó en el periodo 1995/2015 de 15.6 millones de litros (mdl/lts) a 109.4 mdl/lts lo que representa una Tasa de Crecimiento Media Anual (TCMA) de 10.23%. Por otra parte, la producción de tequila en 1995 era de 88.7 mdl/lts y aumentó a 2015 a 119.1 mdl/lts con una TCMA de 1.48%. En total, el país obtuvo una producción de tequila de 228.5 mdl/lts en 2015 significando una TCMA de 4.0% en el periodo 1995/2015. Por su parte, el consumo de agave 1995/2015 para tequila (en general) fluctuó de 278.7 miles de toneladas (Mt) hasta 788.9 Mt, y para el tequila 100% agave se incrementó de 75.3 Mt a 518.8 Mt, para el mismo periodo. Esto refleja el crecimiento acelerado de aceptación y consumo que ha tenido el agave tequilero en la población.

Entre las bebidas más importantes que se destilan del agave se encuentran: el mezcal, el tequila y el bacanora

El Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI) de la Secretaría de Economía, de enero a diciembre de 2015, reportó que las exportaciones de tequila (con fracción arancelaria 22089003) sumaron 1,186 millones de dólares, donde 80.53% de las exportaciones fueron para Estados Unidos de América. El volumen exportado en el mismo año ascendió a 158.8 millones de litros. Los países que más compran tequila son Corea del Sur, España, Francia, Japón, Alemania, Brasil, Inglaterra, Colombia, entre otros. En el año 2014, el valor comercial de las exportaciones de tequila ascendió a 1,171 millones de dólares (77.85% provenientes de Estados Unidos) representando 162.1 mdl.

Por su parte, las exportaciones de mezcal en 2015 (con fracción arancelaria 22089005) sumaron 19.7 millones de dólares, de las cuales 61.13% fueron enviadas hacia Estados Unidos. El volumen exportado en el mismo año ascendió a 2.0 mdl. Los países que importan mezcal son España, Alemania, Inglaterra, Italia, Australia, Canadá, Países Bajos, Francia, entre otros. En 2014, el valor comercial de las exportaciones de mezcal ascendió a 13.3 millones de dólares (57.84% provenientes de Estados Unidos) representando un volumen de 1.8 mdl.

Aun cuando existen avances en el cultivo del agave y mejoramiento de las condiciones sobre la oferta y la demanda, la agroindustria del mezcal enfrenta retos y limitaciones en los diferentes eslabones de la cadena. Por ejemplo, en la producción no existen incentivos para incrementar y mejorar las plantaciones, se carecen de programas eficientes de financiamientos destinados a la plantación, producción, industrialización y comercialización para pequeños productores rurales, así como prácticas de incumplimientos sobre las normas oficiales referentes a inocuidad y calidad; además se presenta una transgresión a las mismas y falta de mecanismos de comercialización y exportación de los subproductos, entre otras.

Hoy en día es imprescindible fortalecer las capacidades científico-tecnológicas para la transformación de biocompuestos de materias primas regionales del agave. Su producción y comercio necesitan desarrollar desde un enfoque de sustentabilidad y el aprovechamiento sostenible fortaleciendo la prospección y sistemas de aprovechamiento sustentable, encadenamiento de generación de valor de la planta (desde la producción, industrialización y comercialización) aunada a la generación de conocimientos sobre los inventarios en las zonas productivas marginadas en el país. De esta manera se fortalecerá la implementación de políticas públicas para el aprovechamiento sustentable de la biodiversidad como riqueza de su desarrollo local.

En definitiva, las organizaciones de productores de agave necesitan mayores capacidades que incorporen modelos de desarrollo exitosos para superar los problemas de producción y comercio apoyándose de instituciones gubernamentales para impulsar el desarrollo de las localidades marginadas y generar empleo, ingresos para mejorar las condiciones de vida de los pobladores. Además, resulta fundamental establecer redes sociales con clientes, centros de investigación y empresas de comercialización de sus subproductos.

5.4 EL ENTORNO SOCIOPOLÍTICO DEL AGAVE: DISPUTAS POR LA REGULACIÓN, PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN MÁS ALLÁ DE SU UTILIDAD PRIMARIA

En lo cotidiano hacer mención del término agave nos remite de manera inmediata a los principales productos que actualmente se obtienen de él ya sea tequila, mezcal, bacanora o pulque. En diferentes escalas y espacios geográficos ha habido intentos por mejorar la producción y alcanzar estándares de calidad requeridos por normas oficiales, así como el debido control y cuidado específico de la planta, sobre todo para la elaboración del mezcal y su relación con las plantaciones de agaves silvestres, legisladas estatalmente para su protección. Cabe mencionar que el agave y su vínculo sociocultural con los productores artesanales le propician saberes no solamente para su cuidado, también para su reproducción y la elaboración de bebidas espirituosas. Una correspondencia íntima y subjetiva entre el hombre y la planta llevada hasta el plano ceremonial-religioso que, por lo general, provee un valor agregado para su comercialización, no sólo en el ámbito local, sino también nacional e internacional.

Actualmente los horizontes del agave se han expandido más allá de lo que principalmente representó su utilidad primaria, por lo que su consumo, producción y comercialización no sólo es atendido por productores artesanales locales, sino por empresas especializadas científica y tecnológicamente para la elaboración de las bebidas espirituosas y otros subproductos derivados de la planta del maguey. En este sentido, es necesario observar la relación que existe en la cadena de producción del tequila, mezcal, bacanora y pulque donde en los últimos años han existido disputas de tipo social, político y económico por la comercialización y el derecho legal de los productos. En estas luchas quienes menos ventajas tienen son los pequeños productores, llevando a un desajuste de las economías campesinas en el mundo rural (muy probablemente sea útil bajar la mirada a la cotidianidad de los actores en juego para entender el nivel de sus problemáticas). Este hecho nos lleva a aseverar que la economía generada por el aprovechamiento del agave en zonas productoras específicas no asegura la calidad de vida, ni el bienestar social de las poblaciones rurales e indígenas donde se producen. Por lo contrario, estas regiones se caracterizan por un alto índice de pobreza, marginación y desigualdad.

Las políticas agropecuarias del país, adaptadas por las influencias del mercado global y de las políticas neoliberales, no han tenido los resultados esperados para la sustentabilidad rural del campo mexicano. Esto, además de desarticular las economías campesinas, ha provocado entre otras cosas la emigración hacia zonas urbanas y la migración a los Estados Unidos con el fin de mejorar las opciones de vida, abandonando el trabajo rural. Igualmente, provoca el detrimento de conocimientos y tradiciones productivas a causa de la implementación de procesos agro-tecnológicos con miras a la industrialización y su economía. Para el caso del tequila:

> *"(…) es interesante analizar el sistema de producción del Agave azul, ya que evoluciona en relación*

> *con su demanda; en las últimas décadas se ha intensificado el uso de insumos externos (fertilización, control de plagas y malezas), así como el incremento de plantas por superficie; también se trabaja ya con más tecnología"* (Gerritsen, Rosales-Adame, Moreno-Hernandez y Martínez-Rivera, 2011, p. 163).

En este escenario es posible observar una redefinición en la relación social y política entre actores vinculados por un mismo factor, en este caso el agave, como un debilitamiento en la base de la organización y producción originaria, enmarcada en un contexto político/económico/institucional que provee su legitimidad y sobre el cual se genera un marco discursivo común en donde coexisten las controversias y luchas (Roseberry, 2002). Este modo de organización y su desarrollo están condicionados por la forma en que se estructuran los espacios sociales y son más visibles en el mundo ordinario de actores clave. Según Macías-Valenzuela y Valenzuela-Zapata (2009):

> *" (...) estos campos deben verse como Campos Económicos Empresariales (CEE), pues la actividad empresarial no es atomística sino grupal, de modo que las decisiones empresariales afectan a otros actores interactuantes en el mismo campo y otros más"* (p. 460), condicionando hasta los espacios más íntimos de la vida social.

Aquí por ejemplo cobran importancia los contratos por arrendamientos, los intermediarios entre los productores y los industriales (también conocidos como *"coyotes"*), como la reorganización del Estado y las políticas públicas destinadas al campo rural mexicano, las cuales han dado forma a las principales demandas de los productores agaveros en los últimos años, donde se perciben también los campos de fuerza y tensión del campo rural mexicano.

La primera de estas experiencias (contratos por arrendamientos, sobre todo en el cultivo del agave azul para la destilación del tequila) nos revela que las tierras agaveras no están siendo aprovechadas directamente por los propietarios productores. Para Hernández y Hernández (2012), esta situación se puede observar del siguiente modo:

> "*El campo agavero, (…) no está en manos de agricultores, de campesinos regionales, sino de empresas tequileras y de intermediarios que controlan las plantas de Agave, los agroquímicos, la fuerza de trabajo, con sus respectivos precios. Como hemos argumentado, la diferencia entre el mezcal y el Agave, además de semántica, es social y de política económica: las mezcalilleras fueron cultivadas por agricultores y sus familias, las ahora denominadas huertas agaveras son cultivadas con una lógica empresarial por campesinos convertidos en jornaleros subordinados a intermediarios o a ingenieros agrónomos*" (p. 27-28).

El desequilibrio de la economía campesina en los productores de agave, aunado al futuro incierto en el logro de las plantaciones, han impulsado los arrendamientos

por contrato. Son dos las razones principales que animan a los productores a rentar sus tierras a empresarios tequileros, por un lado, la seguridad y el beneficio económico que certifica un ingreso de capital para aquellos que no cuentan con posibilidades financieras para cultivar sus tierras, y otro, ya que el cultivo de agave azul relativamente es reciente, los productores temen invertir para después perder los ahorros de muchos años, por lo que encuentran atractiva la trasferencia de paquetes tecnológicos que trae consigo la renta de las tierras, sin arriesgar la economía propia (Gerritsen, *et al.*, 2011), pero afectando de modo directo la naturaleza de la tierra.

El desequilibrio de la economía campesina en los productores de agave, [...] han impulsado los arrendamientos por contrato

Algunas problemáticas generadas por este tipo de asociación son el cambio en el modo producción campesino basado en recursos locales, el conocimiento y apropiación de la naturaleza a través de saberes ancestrales (como los movimientos de la luna y las estaciones del año), por un tipo de producción externa, agroindustrial, de mentalidad administrativa, basado en la tecnificación y el apoyo científico para incrementar la producción. Lo que puede traer como consecuencia daños irreversibles en el ecosistema, la infertilidad de la tierra y una desvalorización en la originalidad de las plantas como en la producción de las bebidas.

"*Rota la estructuración agrícola, se posibilitó una nueva forma de producir, un nuevo calendario agrícola en que el trabajo en el campo no fuera solo estacional sino permanente. Al fabricarse tequila la mayor parte del año, la plantación o la jima son actividades constantes, y requieren para ello las modernas empresas tequileras de la expansión de la superficie agavera, pero también del continuo control de la mano de obra mediante viejas prácticas clientelares*" (Hernández y Hernández, 2012, p. 24-25).

Otro problema por el que atraviesan estas negociaciones es un discurso de buenas intenciones donde, durante y una vez concluido el contrato, la peor parte se queda con los dueños de la tierra, ya que en última instancia estas tierras quedan erosionadas, estériles e improductivas. Los contratos han modificado sus disposiciones; entre 1995 y 1996 había mejores escenarios, los empresarios pagaban la renta de los terrenos (1,300 pesos por hectárea) y ofrecían a sus dueños una participación del 5% en la producción de la cosecha. Actualmente las rentas de la tierra (2 ha) tienen un valor de 1,300 pesos y únicamente si la tierra es fértil y prometedora ofrecen una participación del 3% (Gerritsen y Martínez, 2011).

Por otra parte:

> *"Nunca ha existido autoridad alguna que dé fe de los contratos (ejidales, municipales, otros), mucho menos son notariados, para que "obliguen" de alguna forma a cumplirlos por ley; por ende, se trata de simples acuerdos escritos con testigos de "ambas" partes. En dicho contrato sobresale una de las cláusulas: "los beneficios que queden perdurables, quedarán a favor del arrendador al término del presente contrato". Sin embargo, en ninguna se menciona quién paga los daños ocasionados durante el cultivo (erosión, contaminación, otros). Según esta lógica, el arrendador (dueño de la tierra) también se queda con los "daños perdurables".* (Martínez *et al.*, citados en Garritsen, *et al.*, 2011, P. 177-178).

Otra problemática del mismo entorno es que el cultivo del agave azul en el estado de Jalisco, por su valor comercial ha llegado a otras áreas agrícolas de la zona, provocando un desabasto en tierras dedicadas a las siembras del maíz, sorgo y también en espacios ocupados por la actividad pecuaria. Los pequeños productores hacen frente a sus problemáticas económicas sin vislumbrar el panorama futuro, el cual se percibe totalmente desalentador.

El cultivo del agave azul en Jalisco se ha expandido a áreas agrícolas que tradicionalmente se dedicaban a cultivos básicos como el maíz, sorgo o la actividad pecuaria.

Los intermediarios o *"coyotes"*, se han constituido como una figura que abona un punto de discusión en el cultivo del agave en el país, desvinculando la relación productor/empresario/industrial a productor/intermediario/empresario/industrial. De hecho, el auge de industrias tequileras permitió que las rentas de tierras se dieran, en primera instancia, entre los productores y los intermediarios, y de éstos a la industria y/o empresa. Entre 1998 y 2002 los coyotes controlaron la mano de obra, las plantaciones y como consecuencia las piñas del agave, así como el manejo e implementación de paquetes tecnológicos planeados irresponsablemente.

> *"La presencia de intermediarios erosionó la posibilidad de establecer un vínculo entre productor de Agave y productor de tequila, pero también despreció los conocimientos tradicionales en aras de la modernización agroquímica"* (Hernández y Hernández, 2012, p. 24).

El Estado no está ausente en estas transformaciones del México rural, ha contribuido a través de la implantación de políticas públicas dirigido al agro, pero ignorando los destinos finales que éstos toman. De hecho, en 1997, se incluye al cultivo del agave en el Programa de Apoyos Directos al Campo (PROCAMPO),

aumentando la posibilidad de que pequeños productores pudieran trabajar sus tierras, y otros rentarlas. En un escenario más amplio, hemos sido testigos de las firmas del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) en 1994, en ese mismo año se crea el CRT, con lo que se da pie al "arribo de empresas transnacionales interesadas en invertir en la fabricación de tequila hasta alcanzar gradualmente los campos de cultivo del Agave" (Hernández y Hernández, 2012, p. 24).

Esa misma dimensión de análisis y discusión merece todo lo relacionado con la Denominación de Origen, marco principal para observar las tensiones en juego en la cadena de producción del agave, en busca de una mejora entre los actores interactuantes.

Únicamente se puede elaborar tequila en México en los estados y municipios que marca la Denominación de Origen del Tequila (DOT); es decir Jalisco (125 municipios), Nayarit (8 municipios), Guanajuato (7 municipios), Michoacán (30 municipios) y Tamaulipas (11 municipios), en total 5 estados y 181 municipios. El origen de este fundamento comenzó con las primeras demandas para la legislación del producto. El primero de ellos se remonta a 1928, donde se consideró la producción, instalación y funcionamiento de las fábricas de tequila. Posteriormente, en 1949 se emitió la primera norma de calidad para la bebida. Con la firma del acuerdo de Lisboa, en 1974, México inscribió al tequila como una Denominación de Origen, "que en 1973 ya había sido reconocida por el Federal Register en Estados Unidos" (Macias-Valenzuela y Valenzela-Zapata, 2009, p. 463). Para 1978 se otorgó a México el certificado de origen del tequila por el Register International des appellations d' origen de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) en Génova, Suiza (Castro-Diaz y Guerrero-Beltrán, 2013). En los años noventa el tequila tuvo un repunte, con ello se reconoció, en 1993, al Consejo Regulador del Tequila (CRT), con la misión de vigilar el cumplimiento de la norma oficial. Cabe mencionar que la Norma Oficial Mexicana (NOM) que rige la producción del tequila es la NOM-006-SCFI-2005.

En los últimos años, los problemas en torno al agave tequilero se han dirigido a la reducción del azúcar de agave a 70%, para disminuir los gastos industriales, autorizándose hasta 49% de azúcares de otros agaves. Ahora surge la propuesta de reducir el rango de alcohol de 20% a 55%; este problema, para Carrillo-Trueba (2007), puede solucionarse de la siguiente manera:

> "*Si se autorizaron municipios lejanos al centro de origen de la bebida para atender a todos los productores de agave y de tequila, tener más materia prima y evitar el uso de otros azúcares en la elaboración de la espirituosa, por qué no autorizar la superficie plantada con Agave tequilana Weber azul en zacatecas, Colima, Morelos y Querétaro, que son más cercanos, y así evitar la utilización de otros azúcares, incorporando asimismo como obligación el envasado en la Denominación de Origen*" (p. 44).

La Denominación de Origen se rige por normas dentro del Estado mexicano, la NOM-070-SCFI-1994 (DOF, 1997) es la del mezcal, y el órgano que certifica su acreditación es el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal Mezcal (COMERCAM), reconocido oficialmente en 2003. La Denominación de Origen del Mezcal (DOM) es legalmente reconocida desde 1994. En la primera versión de la DOM se reconocieron únicamente a cinco estados (y algunos de sus municipios) Guerreo, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. En una segunda apertura se incluyó a un municipio de Guanajuato y 11 municipios de Tamaulipas. En este sistema de producción continúan las solicitudes para incluir algunos municipios de las regiones de Oaxaca (la Cañada y la Costa), así como de algunos estados donde se producen destilados como en Jalisco, donde se produce el tuxca (en Tuxcacuesco) y la raicilla (en los límites con Nayarit), el sisal de Yucatán, el comiteco de Chiapas y los mezcales de Sinaloa, entre otros (Carrillo-Trueba, 2007, p. 45).

El pulque, [...] no tiene una Denominación de Origen, aunque hoy existen algunos actores sociopolíticos que comienzan a plantear esta iniciativa.

Por otra parte:

> "*El mezcal es parte de los ritos y ceremonias, el maguey es un recurso que legítimamente les pertenece a las comunidades. Los elevados costos que impone la certificación por (COMERCAM) y el envasado no podrán ser pagados por los productores artesanales independientes, por lo que quedarán expuestos a los abusos de las autoridades que en nombre de la ley, les exijan documentación. Esto sería violatorio del Art. 8., del Convenio de Diversidad Biológica, tratado internacional firmado por nuestro país, así como de la Ley de Vida Silvestre, que garantiza el derecho de las comunidades de hacer extracción para sus ritos y ceremonias*" (Illsley-Granich, 2004, p. 118).

Un dato curioso en la elaboración del mezcal es que la NOM reconoce cinco especies de *Agave* para la elaboración de esta bebida (*Agave agustifolia* Haw, *Agave esperrima* Jacobi, *Agave weberi*, *Agave potatorum* Zucc, *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck spp. *crassispina*), pero no incluye al *Agave cupreata*, el cual es pieza clave para la elaboración de esta bebida en los estados de Guerrero y Michoacán.

La NOM que regula la producción de bacanora es la NOM-168-SCFI-2004. Su observancia y cumplimiento recae en el Consejo Sonorense Promotor de la Regulación del Bacanora, organismo que regula y vigila la producción de esta bebida en

34 municipios del estado de Sonora, que corresponde al territorio amparado por dicha figura jurídica conforme la declaratoria de Denominación de Origen de Bacanora (DOB).

> "*La Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen Bacanora, fue autorizada el 6 de noviembre del 2000. Esta denominación llegó ocho años después de que dejara de ser una bebida proscrita, pues por muchas décadas fue clandestina, lo cual no impidió que estuviera siempre presente en la vida de los pobladores de Sonora, manteniendo en la sombra toda la autenticidad de un producto que ahora se puede degustar de forma legal*" (Carrillo-Trueba, 2007, p. 9).

El pulque, política y económicamente, no tiene una Denominación de Origen, aunque hoy existen algunos actores sociopolíticos que comienzan a plantear esta iniciativa. Socialmente es una bebida histórica, que relaciona a los seres humanos con su cultura, identidad y pasado, y que está viva en la actualidad. Algunos estados que cultivan agave pulquero son Coahuila, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz (Castro-Diaz y Guerrero-Beltrán, 2013).

La Denominación de Origen de productos agroalimentarios hace referencia al lugar de producción, relaciona a sus principales productores con el legado histórico vinculado a su cultura y tradición, la armonía del medio ambiente, geografía y suelo (entorno natural), así como las técnicas y métodos para la elaboración, y en este caso de bebidas, con una larga y ancestral costumbre. En una época como la que atravesamos, de racionalidad neoliberal, observamos que la diferenciación de productos con alto valor agregado poco tiene que ver verdaderamente con la Denominación de Origen, la historia local de las personas, del patrimonio, etc. La Denominación de Origen ha permitido incorporar el lema de *"orgullosamente mexicano"* o *"hecho en México"*, sin embargo:

> "*(…) también ha provocado luchas de poder entre los actores involucrados, los agentes del Estado y otras entidades influyentes, de manera que quienes logran adquirir mayor poder de negociación, tanto dentro de la industria como en las relaciones con agentes clave del Estado, son los que han impuesto la mayor parte de los criterios que limitan [el controversial terreno de la DO]*" (Macías y Valenzuela, 2009 p. 164).

5.5 EL AGAVE Y SU USO EN LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Estudio de la fermentación de mostos a base de jugo de agave a nivel laboratorio en un bioreactor, en Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (Unidad Zapopan).

Entre los usos más comunes que se le dan a esta planta, considerando las diferentes variedades de *Agave*, como ya se ha hecho referencia, es la elaboración de bebidas tradicionales como el pulque, mezcal, bacanora y tequila. Sin embargo, actualmente se ha incursionado en usos menos comunes gracias a los avances tecnológicos y científicos que promueven alternativas más rentables como la elaboración de diferentes productos, entre ellos el biogás, bioenergéticos, así como remedios herbolarios, bebidas hidratantes y fructanos que contribuyen a la mejora de la salud humana (Fuentes-González, 2014).

El uso de los residuos del agave [..] constituye también una vertiende donde la ciencia y tecnología han encontrado un nuevo nicho de desarrollo

El uso de los residuos del agave ya procesado, constituye también una vertiente donde la ciencia y tecnología han encontrado un nuevo nicho de desarrollo, inovando en usos como la fabricación de fibras o hilaturas como textiles, papel moneda y materiales de construcción.

En este contexto y siendo una planta de gran importancia para la investigación científica en México y en el mundo, instituciones tanto públicas como privadas, nacionales e internacionales, se han involucrado en su aprovechamiento. Las múltiples propiedades de esta planta han generado que actualmente se estén desarrollando experimentos para la validación de Ciencia y Tecnología (CyT).

Como muestra representativa del avance en CyT se puede aludir a eventos como el International Symposium on Agave (ISA) que bajo el lema *"Sustainable and integrated exploitation of Agave"*, cada dos años a partir de 2011 es organizado por Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), el cual representa un foro en el que se presentan trabajos que abordan los diversos tópicos en torno a las tendencias científicas, tecnológicas y procesos industriales de los productos y subproductos que se obtienen de esta planta. Por ejemplo, en la emisión realizada en 2014, investigadores de la Universidad de Viena presentaron resultados de un trabajo en el cual analizan la dimensión molecular, rasgos estructurales y funcionales de las propiedades de los fructanos de agave (Müller, Viernstein, Loeppert y Praznik, 2014; Prank y Loeppert, 2014), mientras que en el CIATEJ, evalúan alimentos feculentos con y sin proceso térmicos (Torres-Velázquez, 2015).

Es así que el agave está siendo utilizado para diferentes investigaciones científicas ampliando de esta manera las múltiples posibilidades de explotación del recurso. Gschaedler Mathis, coordinadora de la Red Temática Mexicana para el Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves (AGARED), refiere que actualmente hay tres líneas de investigación dentro de

esta red. La primera tiene que ver con el desarrollo de investigaciones orientadas a buscar los beneficios del agave en relación con cuestiones de salud, en la segunda línea, se estudian la composición de los fructanos del agave, y en un tercer eje el uso del agave para producir bioetanol (Sánchez, 2015).

» *Agave y salud*

Después del proceso de elaboración para la obtención de las bebidas alcohólicas, los desechos de la planta son considerados como subproductos polisacáridos que sirven para la producción de inulinasas microbianas (Huerta-Alcocer, Larralde-Corona y Narváez-Zapata, 2014). Los fructanos son un tipo de azúcar que dependiendo de su estructura (que por lo general es compleja) y sus propiedades, se puede utilizar para la elaboración de productos que pueden complementar tratamientos médicos para personas que padecen problemas de diabetes, obesidad y sobrepeso, además de que ayuda a la absorción de hierro, calcio y magnesio en el organismo ayudando a prevenir la osteoporosis. Entre otras de sus propiedades están la inhibición de bacterias patógenas como *E.coli, Listeria, Shigella, Salmonella*; igualmente inhibe el crecimiento de bacterias cancerígenas.

La bacteria Bacillus tequilensis [...] promueve el incremento de la biomasa vegetal, inclusive en tierras infértiles como es la arena

Por otra parte, una reciente noticia sobre investigaciones realizadas en el Instituto Tecnológico de Jiquilpan (ITJ) en colaboración con el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN) es la creación de una bebida hidratante elaborada con *Agave tequilana* Weber, var. azul, diseñada principalmente para deportistas de alto rendimiento, la cual "favorecerá la rápida hidratación, al mismo tiempo que regula el pH (nivel de acidez) estomacal, proporciona un plus de energía y aporta prebióticos y probióticos que favorecen el tránsito del bolo fecal en el intestino"[3].

Además:

> "*La inulina es una fibra soluble que el cuerpo no es capaz de digerir y por tanto promueve los movimientos intestinales, favoreciendo la eliminación de toxinas; es un potente estimulador del crecimiento de la flora intestinal benéfica, ayuda en la correcta asimilación de nutrientes como calcio y magnesio, mantiene los niveles de colesterol bajos y evita la acumulación de triglicéridos, su*

3. *"Hidratarán atletas con agave"* Disponible en: http://www.mexicoesciencia.com/noticia/410. Consultado: 30 de agosto 2016.

aporte de energía y nutrientes es mínimo, y es por esta particularidad que es recomendable en las dietas" (Madrigal y Sangronis citados en Huerta-Alcocer, Larralde-Corona y Narváez-Zapata, 2014).

» *Agave y biotecnología*

Respecto de los avances en investigaciones en la biotecnología, encontramos que principalmente se están enfocando en las mejoras del cultivo de agave y en la calidad del suelo, procesos de fermentación (Torres, *et al.*, 2015); nuevas alternativas biotecnológicas de multiplicación masiva de agave tequilero debido a su sobreexplotación y la conservación a largo plazo del genotipo para futuras mejoras (Reyez-Díaz, Arzate Fernández, Piña-Escutia y Vázquez-García, 2015); la medición de los fructanos y su grado de polimerización para contribuir en la funcionalidad en la industria de los alimentos (Moreno-Vilet, Flores-Montaño y Camacho-Ruiz, 2015), entre otros.

Otro hallazgo importante en las investigaciones con el agave es la bacteria *Bacillus tequilensis.* Ésta es la que genera el crecimiento de la planta, y se ha descubierto que puede convertirse en un biofertilizante en tanto que promueve el incremento de la biomasa vegetal, inclusive en tierras infértiles como es la arena (*"Investigadores descubren bacteria que biofertiliza el agave"*, 2015). Este descubrimiento trae tanto beneficios económicos como ecológicos, pues ayuda a obtener una mejor calidad de productos.

En el área de biotecnología, podemos también mencionar los procesos de biotransformación:

> " *(...) las alternativas para usar (el) desecho, están los procesos de biotransformación a partir del proceso de composteo, es decir, de la generación de abono orgánico a fertilizante o sustrato… para la elaboración del biogás es importante acondicionar los sustratos de Agave, llevarles a un tratamiento mecánico en donde se puede utilizar las hojas, la pulpa y la vinaza. Posterior a ello, se someten a reacciones químicas para que cumplan las condiciones apropiadas*"[4].

» *Agave y tecnología*

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (Agave para la fabricación de muebles y láminas de construcción 2015) se ha desarrollado una tecnología en la que se dieron a la tarea de buscar cómo utilizar los desechos y residuos generados a partir del procesamiento del agave tanto en la producción de bebidas como de textiles, reduciendo al mismo tiempo niveles de contaminación, pues se calcula que tan

4. *"Investigadores de Oaxaca crean biocombustibles con desechos de agave*". Disponible en: http://revistaderechodigital.com.mx/ciencia-y-tecnologia/investigadores-de-oaxaca-crean-biocombustibles-con-desechos-de-Agave/. Fecha de consulta: 30 de agosto 2016.

sólo en el estado de Oaxaca se generan 43,000 toneladas de bagazo al año. Estos residuos, tratados por el CICY, han sido mezclados con polímeros, obteniendo material similar a la madera y fabricación de láminas.

El recién desarrollo de tecnologías que crean bioplásticos a partir de los residuos del agave nació en México hace un par de años. Una empresa mexicana llamada "*Biosolutions*":

> "*Ha patentado una tecnología para producir bioplásticos sustentables mediante el uso de fibras ricas en celulosa"; actualmente trabajan con las fibras del agave. El residuo del agave que es tratado químicamente "además de reducir el uso de fuentes no renovables como el petróleo, acelera la degradación de los productos en lo que se emplea y proporciona a los productores de tequila una vía para deshacerse de los desperdicios que generan*" (Paniagua, 2015).

Además de lo anteriormente referido, encontramos que también existen nuevas investigaciones en el área de la construcción, ya que se están implementando tecnologías para producir materiales

> " *(…) que permitan el confort térmico de las instalaciones para la producción de animales… (pues) en las zonas cálidas de Oaxaca, en donde se implementa la producción de animales de granja, se detecta un problema, pues con las altas temperaturas los animales dejan de alimentarse, por lo que es necesario desarrollar espacios que en su envolvente utilicen material aislante del calor como el bagazo de Agave*" (CIDIR, 2016)[5].

Con la información ya obtenida y los nuevos descubrimientos podemos dar cuenta de que los llamados residuos y desechos del agave constituyen un subproducto más que un residuo y que forman parte de un importante desarrollo sustentable y ecológico que nos brinda socialmente no sólo beneficios en tecnología sino también en aspectos que aportan beneficios importantes para la salud humana. En este sentido, podemos observar que el agave más allá de un símbolo de bebidas nacionales importantes, es también una punta de lanza para desarrollos científicos en nuestro país.

5. http://revistaderechodigital.com.mx/ciencia-y-tecnologia/investigadores-de-oaxaca-crean-biocombustibles-con-desechos-de-Agave/. Fecha de consulta: 30 agosto 2016.

5.6 LA PROBLEMÁTICA EN LA CADENA DE VALOR DEL AGAVE

La globalización, definida como la "difusión mundial de modos y tendencias que fomenta la uniformidad de gustos y costumbres" (RAE, 2016) ha acelerado vertiginosamente la entrada de nuevos productos, invadiendo los espacios locales y desplazando los productos endémicos de la región. La globalización ha hecho estragos en diversos sectores de la vida social y económica, sobre todo en aquellas tradiciones que datan desde hace miles de años, fraccionando los tiempos, y registrando un choque entre tradición y evolución.

Aunque el escenario de un mundo globalizado pudiera suponer un camino adecuado hacia la apertura de nuevos mercados y por consecuencia, la obtención de un incremento en la competitividad de las organizaciones y el desarrollo humano de la población, esto ha estado limitado por aspectos endógenos y exógenos, que implican el desconocimiento individual y falta de herramientas tecnológicas y estructurales que apoyen la adopción de un pensamiento globalizado.

Con la entrada de mercancías foráneas como pescados, leche, plantas y hortalizas, entre otros (INEGI, 2012), se ha provocado el desplazamiento de las mercancías locales, fracturando y disminuyendo la presencia de productos nacionales en el mercado, obligando a sus actores a repensar la comercialización y giro de su negocio, y con ello poder hacer frente a esta apertura fronteras; sin embargo, el mayor porcentaje de mortalidad de los negocios, paradójicamente se refleja en aquellos que han permanecido más tiempo en el mercado (INEGI, 2016), lo que pudiera reflejar un problema en el traslado de conocimientos hacia los requerimientos de la globalización.

El cultivo de agave es de suma importancia a nivel agro industrial en México, por lo que requiere la atención de diversos aspectos incluidos en su cadena de valor

Por lo anterior, el objetivo de esta sección, es exponer los diversos problemas que registra la cadena de valor del agave en la República Mexicana, principalmente en el sector primario, registrando las dificultades más comunes y presentando algunas acciones que se han adoptado para lograr su solución, y con ello exponer y dibujar el escenario que guarda en la cadena del agave, describiendo su situación actual, pero sobre todo, tratando de contribuir de manera teórica, en la reducción de problemas en el sector agavero.

El cultivo de agave es de suma importancia a nivel agro industrial en México, por lo que requiere la atención de diversos aspectos incluidos en su cadena de valor. Pudiera suponerse que ante la gran variedad de derivados que registra como el aguamiel, jugo, dulce, atole, jarabe, mezcal, pulque, aguardiente, miel, vinagre,

tequila, saborizante, pan, levadura, vestuario, bolsas, mantas, telas, cuerdas, vigas, aditivo para mezcla, jabón, recipientes, adornos, alimento para ave (Flores-Morales, Castañeda-Hidalgo, Sánchez-Pérez, Romero-Aguilar y Ruiz-Luna, 2009), supondría una adecuada coordinación de la cadena de valor, desde su cultivo hasta la comercialización; sin embargo, en la mayoría de las ocasiones no sucede así.

> "*El término cadena de valor se utiliza para caracterizar el conjunto interrelacionado y coordinado de eslabones y vínculos que se producen en la trayectoria continúa desde la producción primaria hasta el consumidor. La producción, la elaboración y la distribución agroalimentaria en todo el mundo se organiza cada vez más en cadenas de valor estrechamente alineadas, en las que las corrientes de insumos, productos, información y recursos financieros están coordinadas estrechamente entre los agricultores, los elaboradores, los minoristas y otros participantes económicos*" (FAO, 2015, párr. 1).

Con el paso del tiempo, gran parte de la problemática en las cadenas de valor del agave proviene, en gran medida, de su traslado tradicional hacia la industrialización. Por ello, ante la presencia de una cadena de valor tradicional como es la del agave en México, la cual está regida por un nivel cultural importante, usos y costumbres, transacciones en el mercado manejadas al contado y que involucran a una gran cantidad de pequeños productores y minoristas (FAO, Fondo Internacional para el Desarrollo Agricola [FIDA] y Oficina Internacional del Trabajo [OIT], 2010), su traslado se ve influenciado por factores adicionales que involucran la adhesión de nuevos procesos, niveles mayores de organización y el involucramiento de tecnología que implica una complejidad mayor, fracturando la relación entre industria y tradición, complicando la sobrevivencia tradicional en los niveles individual y familiar.

Gran parte de la problemática en las cadenas de valor del agave proviene, en gran medida de su traslado tradicional hacia la industrialización

Ante esta situación, los productores primarios se ven en la disyuntiva evolutiva que implica la utilización de elementos que se encuentran fuera de conocimiento, entre los que se incluyen infraestructura y tecnología, complicando el traslado hacia una tradición evolutiva, y obligándolos a continuar en escenarios conocidos y alcanzables, que sean acordes para su bienestar.

> "*Los productores rurales son el punto de partida de la mayoría de las cadenas de valor. Si se les ayuda a aprovechar las oportunidades del mercado, conseguir acuerdos justos y obtener productos de mayor calidad*

será posible mejorar el rendimiento de la cadena de valor, aumentar los ingresos rurales y el empleo y estimular el crecimiento económico de las zonas rurales, salir de la agricultura de subsistencia y obtener ganancias más lucrativas" (OIT, 2012, párr. 1).

Existen registros que refieren que el problema de la cadena de valor del agave se deriva del ciclo tan largo de maduración, lo que hace difícil predecir su comercialización ya que los productores deben ser capaces de cubrir los costos de mantenimiento durante el periodo; algunos otros refieren a los problemas en la falta de calidad de sus procesos para elevar su competitividad (Macías-Valenzuela y Valenzuela-Zapata, 2009), o el acceso limitado a los servicios financieros y comerciales que dificulta la inclusión a cadenas de valor mundiales (OIT, 2012).

Debido a esto, diversas estrategias se han puesto a prueba para enfrentar los problemas en la cadena de valor del agave, por ejemplo los planes gubernamentales en la utilización del agave silvestre, que refieren a la asignación de un porcentaje a diferentes industrias y hacer frente a la sobreproducción; los programas generados para el aprovechamiento integral de los subproductos del agave (García-Salazar y Macías-Rodríguez, 2010); o la creación de fábricas propias para dar valor agregado a la producción (Ruíz, 2010), todo ello con un sentido de mejoramiento de la cadena de valor para lograr la coordinación del productor primario y el comercializador, procurando un equilibrio de costos y beneficios que resulte en una venta adecuada y con ello, poder competir a nivel global.

Aunque el apoyo a la cadena de valor del agave se ha visto beneficiada en sus diversos derivados, aún existen serias diferencias en la integración de las etapas del proceso productivo y organizativo, ya que no están claramente identificados los factores que obstaculizan su eficiencia tratando de enfocarse en las actividades de logística externa, mercadotecnia y ventas (López-Nava, Martínez-Flores, Cavazos-Arroyo y Mayett-Moreno, 2014), lo que obliga a indagar con mayor profundidad la situación actual desde un enfoque sistémico, para identificar los actores y factores clave influyentes en su desarrollo y crecimiento y reducir las dificultades del sector.

Dos derivados del agave y que son de las cadenas más representativas en México están representadas en la producción de tequila y el mezcal. La cadena de valor del tequila comienza con el insumo primario del agave, para su posterior procesamiento e industrialización, distribución y comercialización a nivel nacional e internacional, a través de los detallistas y en el cual existen registros de la participación de 139 industrias y 1,002 marcas (SAGARPA, 2015). En lo que respecta al mezcal, al igual que el tequila, tiene como insumo primario el agave, para pasar al fabriquero o mezcalero y llegar al intermediario para su envasado y distribución, y finalmente llegar al consumidor final (Grupo de Estudios Ambientales, 2002). Estos dos productos son quizá los más fuertes derivados del agave con presencia internacional; sin embargo, aún falta garantizar la equidad de los beneficios económicos de sus distintos actores, incluidos los productores rurales (OIT, 2012).

El cultivo del agave en México, ha manifestado una disminucion en la superficie sembrada y por consecuencia también en la cosechada. Sin embargo, también existen valores positivos como el aumento de la producción y su valor. Esto también es reflejado en la siembra de agave tequilero y mezcalero, ya que, de igual manera, se han registrado disminuciones en la superficie sembrada y cosechada, sólo para el mezcal, no así para el tequila, ya que se muestra un aumento en la superficie cosechada.

TABLA 5.1 Producción de agave en México periodo 2012-2014.

Año	Sup. sembrada (ha)	Sup. cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor producción (miles de pesos)
2014	108, 119.83	21, 731.41	1' 846, 345.07	8' 008, 950.48
2013	128, 133.28	23, 697.11	1' 899, 735.14	3' 253, 323.35
2012	137, 626.27	19, 876.07	1' 686, 337.41	2' 122, 317.95

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2015

TABLA 5.2 Producción de agave mezcalero en México periodo 2012-2014.

Año	Variedad	Sup. sembrada (ha)	Sup. cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor producción (miles de pesos)
2014	Mezcalero	20, 920.05	3, 409.59	217, 784.61	425, 890.18
2013	Mezcalero	22, 391.45	3, 645.38	246, 326.18	310, 202.43
2012	Mezcalero	22, 186.44	3, 978.78	260, 127.76	301, 249.85

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2015

TABLA 5.3 Producción de agave tequilero en México periodo 2012-2014.

Año	Variedad	Sup. sembrada (ha)	Sup. cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor producción (miles de pesos)
2014	Tequilero	80, 291.43	20, 548.10	1' 913,899.61	8' 795,181.34
2013	Tequilero	80, 558.48	11, 127.27	1' 059,927.61	1' 965,933.49
2012	Tequilero	114, 751.83	15, 897.29	1' 426,209.65	1' 821,068.10

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2015

Como puede apreciarse, el agave es de vital importancia en la producción agrícola en México, desde el punto de vista de sus derivados, además de que genera numerosas fuentes de empleo durante su plantación, cosecha, comercialización e industrialización (DOF, 2013). Sin embargo, se debe de considerar un factor que podría afectarlo, como es la disminución en sus plantaciones. El daño que pudiera significar esta situación en futuro actual, es la eliminación o búsqueda de nuevos insumos en los que ya no figure el agave.

Actualmente, el ciclo de la cadena de valor del agave pudiera estar llegando al fin de una era tradicional, una época en donde su elaboración era derivada de un proceso artesanal, y quizá con ello pasando su industrialización. Ante ello, se debe poner especial cuidado y comulgar con un pensamiento sistémico para llevar a todos sus actores hacia escenarios mejores, principalmente sus productores.

Por todo lo anterior, la importancia de investigar y replantear la cadena de valor del agave en México, debe de realizarse atendiendo la importancia cultural de los pueblos mexicanos que datan desde hace miles de años (INEGI, 2007) y ésta debe atenderse de manera inmediata, procurando el bienestar de la que podría ser la planta más representativa de México, el agave.

5.7 PERSPECTIVAS

Ante el derecho justificado de que son muchos los estados que pueden adherirse a la DOM, es necesaria la realización de estudios técnicos justificativos mediante los cuales se demuestre que cumplen con los requisitos establecidos en la Ley de la Propiedad Industrial, de esta manera se abre la posibilidad de sacar de la informalidad a los productores y con ello generar las condiciones propicias para la organización y comercialización de sus productos, además del acceso a la capacitación y asistencia técnica que los productores necesitan.

El aprovechamiento racional del agave parte del hecho que es un recurso natural que tarda en promedio siete años para lograr su etapa de maduración

El aprovechamiento racional del agave parte del hecho de que es un recurso natural que tarda en promedio siete años para lograr su etapa de maduración, condición necesaria para su procesamiento en la elaboración de bebidas alcohólicas tanto destiladas como fermentadas. En este sentido, los productores tendrán la oportunidad de recurrir al establecimiento de plantaciones para el suministro de la materia prima y el desarrollo de esquemas sustentables para su explotación sin poner en riesgo la biodiversidad.

En el caso particular del mezcal, la consolidación del sector se vislumbra como un detonador de la actividad agroindustrial que responde a una necesidad social, ya que en los últimos años la internacionalización de la bebida comienza a dar frutos. Sin embargo, una de las principales limitantes para la consolidación de la cadena productiva Agave-Mezcal ha sido la zona geográfica protegida por la DOM, motivo por el cual la bebida elaborada en estados fuera de ella no tiene un reconocimiento oficial. Desde esta perspectiva, reconociendo la problemática que enfrenta el sector y tomando la experiencia de las regiones del país amparadas por la DOM en el logro del objetivo planteado, es necesario el trabajo conjunto de las instituciones de gobierno y las organizaciones de productores, así como la participación de actores involucrados en cada uno de los eslabones que integran la cadena productiva, para que dicha actividad sea regularizada y desarrollada mediante criterios de sustentabilidad. La expectativa de obtener el respaldo de la DOM, posibilita que se pueda competir con los estados productores amparados por dicha figura jurídica, ya que los estados no incluidos se encuentran en evidente desventaja.

Las diversas actividades inmersas en las cadenas productivas del agave, implican la injerencia de diferentes instituciones de los tres niveles de gobierno, las cuales conjuntamente promueven programas

encaminados a fortalecerlas. En este sentido, es necesario que el gobierno se involucre en este sector no sólo como un aportador de fondos económicos, sino que se convierta en promotor y rector de las políticas de aprovechamiento, producción y comercialización mediante la definición de programas de asistencia técnica y especialización productiva en los que participen las diferentes organizaciones y asociaciones de productores, con la finalidad de obtener productos de la mejor calidad que resulte competitivo en los mercados internacionales.

De igual manera, se requiere la estandarización del proceso necesaria para el cumplimiento de la NOM-070-SCFI-1994 (DOF, 1997), remplazado recientemente por la NOM-070-SCFI-1996 (DOF, 2017), además de la certificación de los productos por parte del Consejo Regulador del Mezcal, para lo cual es necesario canalizar apoyos para la instalación de plantas productoras con carácter comunal, tanto de tipo artesanal o semi industrial, asesoría en la elaboración de marcas colectivas, diseño y registro de marcas, envasado y empaque del producto, así como asesoría en la comercialización basada en la implementación de estrategias y campañas publicitarias, para lo cual es determinante implementar un programa de fortalecimiento comercial y articulación productiva, actividades que necesariamente deben contar con la participación de los tres niveles de gobierno.

Los productores desarrollan esta actividad no como un negocio sino como una tradición o costumbre que se ha venido pasando a lo largo de los años. Si bien es cierto que los productores cuentan con los conocimientos necesarios sobre el proceso de la producción, la mayoría de ellos tiene nula experiencia en el ámbito de la comercialización, situación que ha limitado el nicho de mercado, ocasionando que se venda a granel malbaratándolo, siendo presa de especuladores, por lo que el mercado de sus productos se circunscribe a ámbitos locales y regionales pese a la calidad de los mismos, debido a que no se cuenta con un esquema o modelo de comercialización que integre los conocimientos, la experiencia apropiada y los recursos necesarios para promocionarlo a nivel nacional e incluso internacional.

5.8 IMPACTOS AMBIENTALES DE LA PRODUCCIÓN DE MEZCAL

La biodiversidad de los agaves es un tema de suma importancia considerando la relación cultural y económica generada en torno a su uso. Su estudio ha permitido conocer su distribución geográfica, conocer sus diferentes especies y variedades, lo que ha contribuido a su aprovechamiento y domesticación, sin embargo, el manejo que se hace actualmente de algunas de estas especies pone en peligro su existencia.

Con respecto a la NOM-070-SCFI-1994 se enlistan las especies de *Agave* autorizadas para la elaboración del mezcal, siendo estas:

» *Agave agustifolia* Haw
(maguey espadín)
» *Agave esperrima* Jacobi
(maguey de cerro, bruto o cenizo)
» *Agave weberi* Cela
(maguey de mezcal)
» *Agave potatorum* Zucc
(maguey de mezcal)
» *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck spp. *crassispina* (trel), Gentry
(maguey verde o mezcalero)

La Norma también especifica que se pueden usar otras especies de *Agave*, dejando abierta la posibilidad del uso de otras siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con Denominación de Origen dentro del mismo estado, por lo que además de las referidas, se aprovechan las especies: *Agave inaequidens, Agave cupreata, Agave karwinskii, Agave rhodacantha, Agave maximiliana* y *Agave angustifolia* var. *rubescens.*

Así mismo, la Comision Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) reconoce la existencia de otras especies de magueyes mezcaleros como *Agave hookeri, Agave kerchovei, Agave americana, Agave seemanniana, Agave scabra* sp. *potosinensis* (CONABIO, 2005).

De la planta de agave se pueden obtener otros tantos recursos renovables y a partir de los cuales se promueven tecnologías de punta que buscan brindar beneficios desde aspectos económicos, sociales, médicos e incluso ecológicos. Entre las investigaciones realizadas, se pueden observar polémicas que habrá que considerar, como es la intervención de la iniciativa privada en tanto que la mano de obra y las tierras agaveras pugnan por diferentes intereses.

La creciente demanda por el mezcal en los mercados nacional e internacional necesariamente implica un incremento en la producción, lo que conlleva la necesidad de mayor cantidad de insumos para todo el proceso productivo. De esta forma, tanto para el caso de agaves que son sustraídos del medio natural para producir mezcal artesanal, como para aquellos que son cultivados con la intención de producir mezcal de manera industrializada, manteniendo los niveles de producción constantes sin depender de la disponibilidad del medio natural, implican efectos colaterales que afectan al ecosistema circundante, ya sea natural o construido.

Se ha mencionado anteriormente el concepto de agro ecosistema, como el sistema del cual se aprovechan una o más especies y que está sometido a formas

específicas de manejo o prácticas de cultivo (Gliessman, 2015) incluyan éstas, o no, paquetes tecnológicos como el riego o el uso de agroquímicos. El agro ecosistema genera una serie de interacciones entre los elementos bióticos y los abióticos que tiene disponibles para subsistir. Dependiendo la especie de *Agave* de la que se hable, toma a la planta un promedio de seis años llegar a la etapa adecuada para ser aprovechable en el proceso de elaboración de mezcal; esto es, el estado previo a la inflorescencia de la planta, cuando todos sus azúcares se concentran en el centro (cogollo) para iniciar la reproducción sexual.

La extracción de una cantidad importante de agaves silvestres [...] implica que no habrá semilla para la reproducción de la especie en el ecosistema

En el caso de los agaves silvestres, un alza en la recolección de planta sin prácticas de manejo encaminadas a la repoblación de la especie, implica una reducción de las poblaciones en el futuro, ya que no existirá producción de semilla o siquiera de inflorescencia para estimular la labor de animales polinizadores -normalmente murciélagos o polillas-. La extracción de una cantidad importante de agaves silvestres para producir mezcal implica que no habrá semilla para la reproducción de la especie en el ecosistema.

Si bien hay especies de *Agave* que se propagan de forma vegetativa, si no existe un acuerdo entre los productores artesanales, que son de índole comunitario o ejidal, generalmente, para extraer los hijuelos y plantarlos en zonas específicas de repoblación, existen pocas probabilidades de que esta ventaja reproductiva permita mantener, de manera más exitosa una población constante en el tiempo, para de esta forma estabilizar también la producción a futuro.

Sin embargo, independientemente de que exista un plan de manejo para la propagación vegetativa de agaves (particularmente en el caso de *A. angustifolia* o espadín), este tipo de reproducción disminuye la variabilidad genética que es necesaria entre las poblaciones de cualquier especie para continuar con un proceso evolutivo que le permite adaptarse constantemente al ambiente, generando resistencia ante plagas, estrés hídricos, o bien, cambios graduales en las concentraciones de nutrientes en suelos o aire (Zizumbo-Villareal, Vargas-Ponce, Rosales-Adame y Colunga-GarcíaMarín, 2013).

La reducción del agave en estado de reproducción sexual impacta directamente en las densidades poblacionales de los polinizadores, pues en tanto que la especie es propia de zonas semi-áridas o bien de selvas bajas caducifolias, los agaves proveen el alimento más constante para murciélagos, polillas y algunas abejas. Cuando se reduce la cantidad de agaves,

Jimador de Agave tequilana var. azul, en campo agavero de la destilería "La Alteña". Arandas, Jalisco.

la época de sequía es difícil de sobrevivir para estos animales, que tienden a migrar hacia zonas más alejadas, descontinuando la polinización de otras especies que dependen de ellos para su reproducción, afectando la diversidad biológica del ecosistema (Ilsley-Granich, 2005).

Muchos núcleos poblacionales -ejidos o comunidades indígenas- que poseen dentro de sus tierras de uso común cantidades importantes de agaves, han comenzado a vender la materia prima a los intermediarios o bien a industrias mezcaleras nacientes, para lo cual incluso extraen planta que no ha llegado al nivel de maduración necesaria para elaborar mezcal. Esto implica una mayor cantidad de agave necesario para lograr los sabores del mezcal, que dependen de la cantidad de azúcares disponibles al llegar el momento de la fermentación.

Son todavía pocos los núcleos sociales que tienen planes de manejo o bien de cultivo para reproducir agaves, y algunos emplean técnicas diversificadas de cultivo, combinando la siembra de milpa (maíz, frijol y/o calabaza) con la de maguey. Este tipo de agro ecosistema permite la conservación de suelos y la retención de humedad, así como un mejor aprovechamiento del terreno y reciclaje de los nutrientes gracias a las leguminosas.

En el caso de los mezcales industriales que dependen de una plantación planificada para asegurar un abasto permanente de materia prima, suelen depender de monocultivos tecnificados. Esto es, amplios terrenos sembrados con una sola especie y abonados a nivel del suelo, o bien foliar con insumos químicos, en cantidad y calidad adecuados para la planta en cuestión, pero de manera gradual en el tiempo (Bautista-Cruz, Carrillo-González, Arnaud-Viñas, Robles y De León-González, 2007). El exceso de fertilizantes, herbicidas e insecticidas –los tres tipos de químicos que se aplican a plantaciones industriales- provoca lixiviados de los insumos químicos hacia las corrientes fluviales o pluviales de la región, así como a otros terrenos circundantes, cuyas consecuencias en los ecosistemas naturales aún hace falta comprender.

Sin embargo, siguiendo las tendencias de las consecuencias del uso de agroquímicos en suelos, podemos inferir que la salinización es una de ellas, debido al elevado uso de compuestos nitrogenados que a menudo no son empleados en su totalidad por la planta. Los excedentes de los químicos no empleados tienen un efecto de acumulación o de fuga con la llegada de las lluvias, que es cuando inicia su circulación por terrenos circundantes o bien por las corrientes de agua regionales (Martínez-Rivera, 2007).

Los impactos del monocultivo industrializado van más allá del empobrecimiento de los suelos por el uso de insumos químicos. El agave es una planta que requiere de sol directo, pero que genera poca cobertura para el suelo en donde se establece. Si bien sus raíces generan un efecto de retención de suelos en agro ecosistemas diversificados, o bien en laderas con inclinación significativa (Bautista-Cruz *et al.*, 2007) en monocultivos, que se llevan a cabo en suelos arenosos propios de las regiones en las que se produce el mezcal y se reproduce el agave, es común la erosión acelerada de los suelos de partícula fina (Martínez-Rivera, 2007).

Algunos monocultivos han logrado mitigar la erosión del suelo y la necesidad de insumos químicos con prácticas como la cobertura del terreno con las hojas del agave que no se usan en la producción del mezcal, así como enterrando los residuos fibrosos del proceso de fermentación, lo cual requiere de una intensificación en la mano de obra, prácticas con resultados adecuados desde el punto de vista ambiental (Bautista-Cruz *et al.*, 2007; Zizumbo-Villareal *et al.*, 2013).

Un impacto significativo de los monocultivos, en general, pero en particular de aquellos que emplean la reproducción vegetativa o clonal para generar sus renuevos, es la escasa resistencia a plagas que se genera al no contar con la posibilidad de diversificar genéticamente al cultivo. Esto

genera la necesidad de mayores plaguicidas para combatir las principales plagas y enfermedades del maguey, como son el picudo del agave, hongos (*Fusarium, Cercospora*), bacterias (*Pectobacterium*) u otras.

La producción, principalmente artesanal de mezcal, implica el uso de leña como combustible para dos momentos cruciales, la cocción de las piñas y la destilación de la bebida. Esto implica el corte de árboles del ecosistema para poder generar el calor necesario que se extrae, para ahorrar costos, de la biomasa forestal en las pequeñas y medianas industrias mezcaleras.

Tanto en la producción artesanal como en la industrial, se emplean volúmenes importantes de agua para los procesos de fermentación y destilación

Las empresas mezcaleras rurales-artesanales, llamadas también "*trapiches*", "*vinatas*", "*fábricas*" o "*palenques*", que emplean leña local (o bien comprada en comunidades vecinas) suelen encontrarse en las zonas más pobres de los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Morelos, Puebla, Estado de Mexico, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, Sinaloa y Chihuahua, en zonas de vegetación xerófita o bien selva baja, en donde los maderables no son reforestables a corto plazo, y en donde tampoco son predominantes (FAO, 1991).

El estado de Jalisco es el principal productor de tequila en el país, sin embargo, en esta entidad la fabricación de la bebida se lleva a cabo de forma totalmente industrial, con el uso de autoclaves para el cocimiento. Para algunos consumidores el sabor resultante de este proceso no refleja el carácter artesanal que el mezcal adquiere y el cual es dado por el proceso de cocimiento con leña (FAO, 1991). Actualmente ya se ha desarrollado también la fabricación industrializada de mezcal en otros estados de la República, disminuyendo la dependencia de la leña para los procesos calóricos, una gran parte de los consumidores nacionales prefiere aquellos de carácter artesanal, por las notas sensoriales que le confiere la leña, éste es uno de los retos más importantes que tiene la tecnología para lograr conservar características organolépticas con formas alternativas de producción (Terrazas, 2016).

El último problema ambiental al que nos referiremos con respecto de la elaboración de mezcal, es la cantidad de agua que se emplea para cada cocimiento. Tanto en la producción artesanal como en la industrial, volúmenes importantes de agua se emplean para el proceso de fermentación y para el de destilación, donde se usa circulante para el enfriamiento del alambique. En fábricas rurales, la calidad del agua es determinante en el sabor resultante del mezcal; de hecho, los palenques o trapiches se ubican en función del agua

de calidad, puesto que es determinante para el proceso de fermentación. Para producir 50 L de mezcal se necesitan en la etapa de fermentación alrededor de 200 L de agua.

En tanto que la mayor parte de los recursos para la producción del mezcal se extraen del medio natural, la extracción no regulada de agaves con la consecuente disminución de polinizadores, así como la tala inmoderada de árboles para obtención de leña, generan un desequilibrio para la recarga de acuíferos, los cuales además suelen recibir los residuos del proceso de destilación y de fermentación, adquiriendo un grado de contaminación en el cauce que continúa a partir del palenque.

En el caso de la producción industrial, el uso de agua no es un problema en tanto que las plantas pueden tener también un apartado purificador, pero al depender de monocultivos tecnificados con insumos químicos, la industria contribuye también a la contaminación de los mantos freáticos de las aguas circulantes en el medio natural.

Ninguno de estos problemas es irresoluble y actualmente muchas comunidades están generando acuerdos comunitarios e intercomunitarios para fijar zonas de repoblamiento de agaves, o bien de protección de las plántulas, de forma que puedan asegurar tener densidades de poblaciones que sean suficientes a futuro, tanto para la producción de bebidas y otros productos derivados del maguey como para asegurar la existencia de polinizadores, como el caso del ejido Mochitlán en Guerrero (Mezcologia, 2016), o las prácticas sustentables de manejo agroecológico en Valles Centrales de Oaxaca, según lo documentado por Bautista-Cruz *et al.,* (2007).

Igualmente, centros de investigación como el CIATEJ, en conjunto con empresarios, están diseñando desarrollos tecnológicos innovadores para el uso eficiente de los recursos en la producción de mezcal, así como el aprovechamiento de los residuos del agave para maximizar la eficiencia de los aportes de la planta y obtener más subproductos de la misma.

El éxito que en la actualidad tiene el mezcal puede tener impactos benéficos para la economía de los núcleos productores, sobre todo artesanales; sin embargo, estar conscientes de los encadenamientos sistémicos en el medio natural, nos puede permitir transitar hacia prácticas sustentables, que fomenten agro ecosistemas diversificados que permitan la continuidad de múltiples especies y funciones ecológicas interconectadas, minimizando los impactos negativos.

5.9 CONCLUSIONES

El sentimiento de pertenencia y representatividad situada alrededor del agave, deriva de una poderosa pasión representada en cada una de sus hojas que simbolizan miles de años de conocimiento alrededor de la planta. Considerada como una pieza clave en la historia social y cultural, el mundo simbólico que en ella se guarda, es llevado hasta un plano ceremonial y religioso, incluyéndose en lo más profundo de la espiritualidad del ser humano. Desde una mirada en retrospectiva, podemos observar cómo las tradiciones y costumbres están envueltas o atravesadas por significaciones que han dado pie a la construcción del mundo simbólico del agave, desde mitos y leyendas como la historia de Mayahuel, festividades, fiestas patronales, hasta el desarrollo de una economía internacional importante.

Actualmente su diversidad regional es un reflejo de la gran variedad existente en nuestro país y aunque se ha avanzado mucho, aún falta camino por recorrer en el campo científico y tecnológico que apoye las áreas de salud y alimentación, pero sobre todo, que sean un beneficio importante para el sector social y el ecosistema en general.

Aunque es un hecho que la globalización y la lógica capitalista están obligando a la adopción de nuevas tecnologías, infraestructuras y procesos científicos, se apuesta a la posibilidad de un trabajo coordinado que incluya lo anterior con las tradiciones, preservando la historia e identidad cultural, así como los ecosistemas existentes.

Las herencias de saberes del agave están trascendiendo más allá de su uso común, lo que representa la posibilidad de continuar el proceso de aprendizaje y creación de nuevos conocimientos hacia un mejor horizonte. Es un hecho que se deben de atender los problemas sociales, políticos y económicos encontrados alrededor del agave y diversos puntos en su cadena de valor, aunque con la coordinación de gobierno, academia, sociedad y a través de un proceso conjunto, se podrán adquirir nuevos acuerdos que eliminen las controversias y luchas abonando a una tradición de antaño.

Se presentan una serie de perspectivas en donde se detecta claramente la necesidad de seguir investigando en los diferentes temas relacionados con el agave. Se percibe la importancia de plantear proyectos multidisciplinarios con posibles impactos en los sectores social, economico y productivo. La AGARED pretende contribuir a esta importante tarea para que los agaves considerados como un importante patrimonio de México se conviertan en una gran oportunidad de desarrollo y crecimiento de las regiones.

5.10 REFERENCIAS

Alanís-Flores, G. & González-Álvarez, M. (2011). *Formas de uso de los magueyes (Agave spp.) en Nuevo León, México.* En Revista Salud Pública y Nutrición, edición especial 5, 287-299.

Barrios-Ayala, A., Ariza-Flores, R., Molina-Muñoz, J. M., Espinosa-Paz, H. & Bravo-Mosqueda, E. (2006). *Manejo de la fertilización en magueyes mezcaleros cultivados (Agave spp.) de Guerrero.* Iguala, Guerrero, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Iguala. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3637/2591%20Fertilizacion%20de%20magueyes%20mezaleros.pdf?sequence=1

Bautista-Cruz, A., Carrillo-González, R., Arnaud-Viñas, M. R., Robles, C. & De León-González, F. (2007). *Soil fertility properties on Agave angustifolia Haw. plantations.* Soil and Tillage Research, 96 (1-2), 342-349. DOI: 10.1016/j.still.2007.08.001

Carrillo-Trueba, L. (2007). *Los destilados de agave en México y su Denominación de Origen.* Ciencias, 87, 40-49. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://www.ejournal.unam.mx/cns/no87/CNS087000007.pdf

Casiano, H. (2015). *Importancia económica de la producción del mezcal en el estado de Oaxaca.* Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.

Castillo, D., Mares, O. & Villavicencio, E. (2011). *Lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.), planta suculenta de importancia económica y social de las zonas áridas y semiáridas de México.* Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas, 8 (2), 6-9.

Castro-Díaz, A. S. & Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). *El agave y sus productos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos,* 7 (2), 53-61. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Castro-Diaz-et-al-2013.pdf

Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste S.C. (CIBNOR). (2015). *Hidratarán a atletas con agave.* México es ciencia. Consultado el 30 de agosto de 2016 de http://www.mexicoesciencia.com/noticia/410

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. (2016). *Investigadores de Oaxaca crean biocombustibles con desechos de agave.* Revista derecho digital. Consultado el 30 de agosto de 2016 de http://revistaderechodigital.com.mx/ciencia-y-tecnologia/investigadores-de-oaxaca-crean-biocombustibles-con-desechos-de-Agave/

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Conabio. (2005). *Los magueyes mezcaleros* (Tríptico). Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://mezcalestradicionales.mx/mezcales_herencia_cultural_y_bio/Ponencias%20PDF/23%20TRIPTICO%20MAGUEYES%20CONABIO.pdf

Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). (2010). *Localidades indígenas.* Catálogo de Localidades Indígenas 2010. http://www.cdi.gob.mx/localidades2010-gobmx/index.html Última consulta, 15 de agosto del 2016.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (2015). *Agenda de Innovación de Guerrero.* Resumen ejecutivo. URL: http://www.agendasinnovacion.mx/wp-content/uploads/2015/07/AgendaGuerrero.pdf . Última consulta, 15 de Agosto del 2016.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (2015). *Agenda de innovación de Oaxaca.* Resumen ejecutivo. URL: http://www.agendasinnovacion.mx/wp-content/uploads/2015/07/Agenda-Oaxaca1.pdf. Última consulta 25 de Agosto del 2016.

Consejo Nacional de Población-CONAPO. (2015). *México en cifras.* Consultado el 13 de diciembre de 2015 de http://www.conapo.gob.mx/

Consejo Regulador del Tequila-CRT. (2015). *Estadísticas.* Consultado el 18 de diciembre de 2015 de https://www.crt.org.mx/

Consorcio de Productores Artesanales BINNIZA Zapoteca. (2014). *Denominación de origen y certificación de mezcal.* Bacanda. Consultado el 3 de diciembre de 2015 de http://bacanda.mx/es/content/denominación-de-origen-y-certificaci%C3%B3n-de-mezcal

Creadess. (2014). *Agave para la fabricación de muebles y láminas de construcción.* Consultado el 22 de diciembre de 2015 de http://www.creadess.org/index.php/informate/sostenibilidad-socio-ambiental/cyt-para-la-sostenibilidad/28331-agave-para-la-fabricacion-de-muebles-y-laminas-de-construccion

Cruz-Ramos, C. (2010). *Química aplicada y la división de química.* En L. Del Castillo, M. Robert, A. Larqué & I. Higuera (Eds.), CICY: *treinta años de labor científica y educativa* (pp. 51-62). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://www.cicy.mx/documentos/cicy/ultimas_noticias/cicy_30_anos_de_labor_cientifica_y_educativa.pdf

Diario Oficial de la Federación-DOF. (1997). *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.* México. Consultado el 3 de diciembre de 2015 de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883475&fecha=12/06/1997

Diario Oficial de la Federación. (2013). *Acuerdo por el que se establece la campaña y las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control y en su caso erradicación del picudo del agave, así como disminuir el daño de las enfermedades asociadas a dicha plaga en la Zona Denominación de Origen Tequila.* En: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284294&fecha=08/01/2013 Última consulta el 9 de diciembre de 2015

Diario Oficial de la Federación-DOF. (2017). Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016. *Bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones.* México. Consultado el 15 de marzo de 2017 de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017

Flores-Morales, A., Castañeda-Hidalgo, E., Sánchez-Pérez, F. J., Romero-Aguilar, L. & Ruiz-Luna, J. (2009). *Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero Agave salmiana en el altiplano mexicano.* Agricultura sostenible, 6. México: Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible. Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://www.somas.org.mx/pdf/pdfs_libros/agriculturasostenible6/61/42.pdf

Fuentes-González, J. (2014). *En octubre, el CIATEJ organizará el II Simposio Internacional del Agave.* CONACYT Agencia Informativa. Consultado el 21 de diciembre de 2015 de http://conacytprensa.mx/index.php/ciencia/mundo-vivo/177-en-octubre-el-ciatej-organizara-el-ii-simposio-internacional-del-Agave

Gallardo-Valdez, J., Gschaedler, A. C., Cházaro-Basañez, M. J., Rodríguez, J. M., Tapia, E. & Villanueva, S. (2008). L*a producción de mezcal en el estado de Michoacán.* Morelia, Michoacán, México. Gobierno del Estado de Michoacán, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

García-Mendoza, A. (2007). *Los agaves de México.* Ciencias (87), 14-23. Consultado el 5 de diciembre de 2015 de http://www.revistaciencias.unam.mx/es/busqueda/autor/48-revistas/revista-ciencias-87/285-los-agaves-de-mexico.html

García-Mendoza, A. (2012). *México, país de magueyes.* La Jornada, 53. Suplemento La Jornada del campo. Consultado el 5 de diciembre de 2015 de http://www.jornada.unam.mx/2012/02/18/cam-pais.html

García-Salazar, A. & Macías-Rodríguez, F. J. (2010). *Producción de maguey y mezcal: estrategias de desarrollo rural en Teúl de González Ortega, Zacatecas.* Revista de Geografía Agrícola (45), 7-17.

Gerritsen, P. R., Rosales-Adame, J. J., Moreno-Hernández, A. & Martínez-Rivera, L. M. (2011). *Agave azul y el desarrollo sustentable en la cuenca baja del río Ayuquila, Costa Sur de Jalisco (1994-2004).* Región y Sociedad, 23 (51), 161-192.

Gliessman, S. & Engles, E. (2015). *Agroecology. The ecology of sustainable food systems.* Florida, EE.UU.: CRC-Taylor & Francis.

Grupo de Estudios Ambientales. (2002). *Informe de Mercadeo Maguey/Mezcal.* Guerrero, México: Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente-Centro de Monitoreo de la Conservación del Ambiente. Consultado el 17 de diciembre de 2015 de http://r4d.dfid.gov.uk/PDF/Outputs/Forestry/R7925f_Maguey-mezcal.pdf

Hernández, J. & Hernández, E. (2012). *La vida social del agave tequilero.* Carta Económica Regional, 23/24, (108/110), 13-36.

Huerta-Alcocer, A. S., Larralde-Corona, C. P. & Narváez-Zapata, J. A. (2014). *Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas.* Revista Bio Ciencias, 3 (1), 3-15. Consultado el 20 de diciembre de 2015 de http://editorial.uan.edu.mx/biociencias/article/view/109/86

Ibarrola-Rivas, M. J. (2010). *Sustainability analysis of agave production in Mexico.* Países Bajos: Default Journal.

Illsley-Granich, C. (2004). *Las leyes que regulan el aprovechamiento del maguey y del mezcal. Manual para de manejo campesino de magueyes mezcaleros silvestres.* Grupo de Estudios Ambientales., México.

Ilsley-Granich, C., Gómez-Alarcón, T., Rivera-Méndez, G., Morales-Moreno, M. P., García-Bazán, J., Ojeda-Sotelo, A., Calzada-Rendón, M. & Mancilla-Nava, S. (2005). *Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto núm. V028.* Grupo de Estudios Ambientales, México.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI. (2007). *El cultivo del Agave tequilero en Jalisco.* Censo Agropecuario. México. Consultado el 17 de diciembre de 2015 de http://www3.inegi.org.mx/sistemas/componentes/previsualizador/vista.aspx?arch=/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/agropecuario/2007/agricola/agave_teq/AgaveTeqJal.pdf&tipo=1

Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI. (2012). *El sector alimentario en México 2012.* Serie de estadísticas sectoriales, 26. Consultado el 16 de diciembre de 2015 de http://www3.inegi.org.mx/sistemas/componentes/previsualizador/vista.aspx?arch=/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2012/sam2012.pdf&tipo=1

Instituto Nacional de Estadística y Geografía-INEGI. (2016). *Esperanza de vida de los negocios en México.* Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/Investigacion/Experimentales/esperanza/default.aspx

Tierra Fertil (2015) *Investigadores descubren bacteria que biofertiliza el agave.* Consultado el 22 de diciembre de 2015 de http://www.tierrafertil.com.mx/descubren-bacteria-que-biofertiliza-al-agave/

Lazcano-Arce, J. (2011). *Estudio etnoarqueológico de la bebida del mezcal como modo de trabajo durante el periodo formativo en el sitio de Xochitecatl-Cacaxtla-Nativitas.* Tesis de doctorado no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

López-Nava, G., Martínez-Flores, J. L., Cavazos-Arroyo, J. & Mayett-Moreno, Y. (2014). *La cadena de suministro del mezcal del estado de Zacatecas. Situación actual y perspectivas de desarrollo.* Contaduría y Administración, 59 (2), 227-252. DOI: 10.1016/S0186-1042(14)71261-6

Lorenzo-Monterrubio, A. (2007). *Las haciendas pulqueras de México.* Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Macías-Valenzuela, A. & Valenzuela-Zapata, A. G. (2009). *El tequila en tiempos de la mundialización*. Comercio exterior, 59 (6), 459-472. Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/127/3/459_Macias_Valenzuela.pdf

Martínez-Rivera, L. M., Gerritsen, P., Rosales-Adame, J. J., Moreno, A., Contreras, S., Solís, A., Rivera, L., Cárdenas, O., Iñiguez, L., Cuevas, R. Palomera, C., García, E., Aguirre, A. & Olguín, J. L. (2007). *Implicaciones socio-ambientales de la expansión del cultivo de Agave azul (1995-2002) en el municipio de Tonaya, Jalisco, México.* En P. Colunga-García Marín, A. Larqué-Saavedra, L. Eguiarte & D. Zizumbo-Villarreal (Eds.), *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves.* Centro de Investigación Científica de Yucatán, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto Nacional de Ecología, México. Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/537.pdf

Mezcología. (2016). *Productoras de mezcal de Mochitlán, Guerrero.* En: http://mezcologia.mx/productoras-de-mezcal/ , última consulta el 6 de septiembre de 2016

Moreno-Vilet, L., Flores-Montaño, J. L. & Camacho-Ruiz, R. M. (2015). *Estudio de estandarización de un método alternativo y sencillo para determinar perfil de tamaño de los fructanos de agave.* Ponencia realizada en XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Guadalajara, Jalisco, México. Consultado el 20 de diciembre de 2015 de http://smbb.com.mx/congresos%20smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/XII/XIIC-08.pdf

Mueller, M., Viernstein, H., Loeppert, R. & Praznik, W. (2014). *Prebiotic effect of fructans isolated from different plant sources.* II International Symposium on Agave (ISA). Sustainable and integrated exploitation of Agave. Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño.

Oficina Internacional del Trabajo-OIT. (2012). *Desarrollo rural a través del trabajo decente. Cadenas de valor para el desarrollo rural.* Consultado el 17 de diciembre de 2015 de http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_emp/---emp_ent/---ifp_seed/documents/publication/wcms_235470.pdf

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. (1991). *Cinco estudios de caso sobre el uso de dendroenergía en industrias rurales de México.* Santiago, Chile. Dirección de Productos Forestales- Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Consultado el 23 de noviembre de 2015 de http://www.fao.org/docrep/006/ad096s/AD096S00.htm#TOC

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. (2015). *Politicas publicas para la inclusión de la agricultura familiar en los sistemas de cadenas de valor.* Consultado el 16 de diciembre de 2015 de http://www.fao.org/in-action/capacitacion-politicas-publicas/es/

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO & Bruinsma, J. (2003). *World agricultura*. Towards 2015/2030, a FAO.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO, Fondo Internacional para el Desarrollo Agrícola-FIDA & Oficina Internacional del Trabajo-OIT. (2010). *El desarrollo de las cadenas de valor agrícola: ¿amenaza u oportunidad para el empleo femenino?* Género y empleo rural, documento de orientación, 4. Consultado el 17 de diciembre de 2015 de http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_emp/documents/publication/wcms_176253.pdf

Paniagua, E. (2015). *Bioplásticos sostenibles fabricados con residuos de tequila.* MIT Technology Review. Consultado el 22 de diciembre de 2015 de http://www.technologyreview.es/tr35mexico/1270/ana-laborde/

Payno, M. (1864). *Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos.* Imprenta de A. Boix, a cargo de Miguel Zornoza, México.

Prank, W. & Loepper, R. (2014). *Molecular dimension, structural features and funtional properties of Agave fructan.* II International Symposium on Agave (ISA). Sustainable and integrated exploitation of Agave. Guadalajara, Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño, p. 19.

Ramírez-Rodríguez, R. (2007). *La representación popular del maguey y el pulque en las artes.* Cuicuilco, 14 (39), 115-149. Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://www.redalyc.org/pdf/351/35111319006.pdf

Real Academia Española (RAE). (2016). *Diccionario de la lengua española. Edición del Tricentenario.* En: http://dle.rae.es/?w=diccionario, última consulta 10 de agosto del 2016.

Reyes-Díaz, J. I., Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L. & Vázquez-García, L. M. (2015). *Efecto de la sacarosa y su interacción con nitrógeno orgánico en la embriogénesis somática de agave mezcalero (Agave angustifolia).* Ponencia realizada en XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México. Consultado el 21 de diciembre de 2015 de http://smbb.com.mx/congresos%20smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/XII/XIIC-09.pdf

Roseberry, W. (2002). *Hegemonía y lenguaje contencioso.* En J. Gilbert & D. Nugent (Eds.), *Aspectos cotidianos de la formación del Estado, la negociación y la revolución en el México moderno* (pp. 213-226). Ediciones Era (Trabajo original publicado en 1994), México.

Ruiz, V. (2010). *Agaveros sufren exceso en la oferta.* Fundación de Investigaciones Sociales. Consultado el 10 de diciembre de 2015 de http://www.alcoholinformate.org.mx/infoalcohol2.cfm?id_infoalcohol=FISAC2452

Sánchez, V. (2015). *Investigan propiedades del agave.* CONACYT Agencia Informativa. Consultado el 22 de diciembre de 2015 de http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/quimica/4142-investigan-propiedades-del-Agave

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-SAGARPA. (2015). *El sistema producto Agave-Tequila en Michoacán. Bases y estrategias para mejorar su competitividad.* Consultado el 16 de diciembre de 2015 de http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/Lists/Evaluaciones%20Externas1/Attachments/31/compt_Agave.pdf

Secretaría de Economía. (2015) *Sistema de Información Arancelaria-SIAVI.* Consultado el 10 de diciembre de 2015 de http://www.economia-snci.gob.mx

Serra-Puche, M. & Lazcano-Arce, J. (2009). *Producción, circulación y consumo de la bebida del mezcal arqueológico y actual.* En J. Long-Towell & A. Attolini-Lecón (Coords.), *Caminos y mercados de México* (pp. 169-184). Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto de Investigaciones Históricas, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México. Consultado el 23 de agosto de 2016 de http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/caminosymercados/cm010.pdf

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP. (2016). *Bases de datos 2016.* Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://www.gob.mx/busqueda?utf8=%E2%9C%93&site=siap&q=produccion+agricola+por+cultivo

Sierra, P. (2005). *El maguey, el pulque y sus deidades.* Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Suárez, A. (2012). *Percepciones estéticas entorno al paisaje del agave y del tequila.* Carta Económica Regional, 23/24 (108/110), 59-80.

Terrazas, F. (2016). *Changing conversations.* Más Mezcal. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://www.masmezcal.com/mezcalvago/changing-conversations

Torres-Velázquez, D. S., Paez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., Urtiz-Estrada, N., Soto-Cruz, N. O. & López-Miranda, J. (2015). *Extracción de ADN de microorganismos presentes en mosto de agave.* Ponencia realizada en XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco. Consultado el 26 de agosto de 2016 de http://smbb.com.mx/congresos%20smbb/guadalajara15/PDF/XVI/trabajos/XII/XIIC-06.pdf

Villaseñor, J. (2004). *Los géneros de plantas vasculares de la flora de México.* Boletín de la Sociedad Botánica de México, 75, 105-135.

Zizumbo-Villarreal, D., González-Zozaya, F., Olay-Barrientos, A., Platas-Ruiz, R., Cuevas-Sagardí, M., Almendros-López, L. & Colunga-García Marín, P. (2010). *Importancia cultural precolombina del Agave spp. en el valle de Colima.* Arqueología, 44, 179-195.

Zizumbo-Villarreal, D., O. Vargas-Ponce, J. J. Rosales-Adame, and P. Colunga García Marín. (2013). *Sustainability of the traditional management of Agave genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western Mexico.* Genetic Resources and Crop Evolution 60: 33-47.

CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

CIATEJ

Este trabajo escrito por 80 integrantes de la AGARED, que inició sus actividades en el año 2015, es reflejo de la pruralidad de contenidos como una fortaleza en la generación de productos para la divulgación de la ciencia, y en particular de aquellos que estudian las diferentes aplicaciones del agave.

El principal objetivo de la Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves, es conformar y consolidar una red multidisciplinaria mediante sinergias de investigadores y estudiantes nacionales, internacionales así como empresas, fomentando la comunicación para incentivar la colaboración entre sus integrantes en un contexto académico-científico haciendo énfasis en la vinculación con el sector productivo.

9 786079 754853