

Elaboración de una bebida alcohólica fermentada a base de tortilla de maíz (*Zea mays*) Elaboration of a fermented beverage based on corn (*Zea mays*) tortilla

Barbosa-Luna, Y. S.¹, Escamilla-Flores, J. Y.¹, Hernández-Vidal, E.¹, Leyva-Cernas, S. E.¹, López-Franco, F. D.¹, Meneses- López, C. N.¹, Reyes-Rojas, Joaquina.¹, Díaz-Orejan Erika Teresa^{*1}

¹ Ingeniería en Procesos Bioalimentarios de la Universidad Tecnológica de Tehuacán. Prolongación de la 1 sur No. 1101, San Pablo Tepetzingo C.P. 75859, Tehuacán, Puebla, México. *erika.diaz@uttehuacan.edu.mx

Resumen

La tortilla de maíz es un alimento básico en la dieta de los mexicanos, es rica en calcio, fibra y potasio. En México, el 28% representa la merma de producción, debido a esto se pretende ofrecer una alternativa de aprovechamiento, por lo anterior surgió la inquietud de diseñar una bebida alcohólica fermentada a base de tortilla de maíz. Una vez planteada la idea se realizó un diseño de experimentos donde se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta (RSM) central compuesto (CCD) rotatable ($\alpha = 1.41421$) que consiste en una factorial 2^k (donde $k = 2$ factores) con 4 puntos factoriales, 5 centrales, 4 axiales y 2 variables de respuesta: etanol y azúcares reductores. El mejor tratamiento con 25°Brix y 2.5 g/L de levadura, se escaló a un biorreactor de 15L de capacidad y se realizó una cinética de fermentación midiendo cada 8h por un periodo de 72 h azúcares reductores, °Brix, etanol, densidad, acidez, pH, biomasa y cuantificación de acetaldehídos. Se obtuvo un producto con contenido de etanol de 22%, que de acuerdo a la NOM-142-SSA1/SCFI-2014 se encuentra bajo la clasificación como bebida de contenido alcohólico alto.

Palabras claves: Tortilla, fermentación, bebida fermentada, cinética.

Abstract

The corn tortilla is a basic food in the diet of Mexicans, it is rich in calcium, fiber and potassium. In Mexico, 28% represents the reduction of production, due to this it is intended to offer an alternative use, for the above, arise from a fermented alcoholic beverage based on corn tortilla. Once the idea was put forward, an experimental design was carried out where the methodology of the rotatable composite Response Surface (CMS) (CCD) ($\alpha = 1.41421$) was applied, which consists of a factorial 2^k (where $k = 2$ factors) with 4 Factorial points, 5 central, 4 axial and 2 response variables: ethanol and reducing sugars. The best treatment with 25 ° Brix and 2.5 g / L of yeast, was scaled to a bioreactor of 15L of capacity and a medium fermentation kinetics was performed every 8h for a period of 72 h reducing sugars, ° Brix, ethanol, density, acidity, pH, biomass and quantification of acetaldehydes. A product with an ethanol content of 22% was obtained, which according to NOM-142-SSA1 / SCFI-2014 is classified as a high alcohol content drink.

Key words: tortilla, fermentation, fermented beverage, kinetics.

1* Autor responsable

Recibido: Mayo 2019. Aceptado: Agosto 2019

I. INTRODUCCIÓN

El alcohol es producido por la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol (Carretero, 2013). La levadura produce enzimas, sustancias que actúan sobre el azúcar y los compuestos que después se forman; el proceso termina con la formación de unos productos principales, que son alcohol y anhídrido carbónico, y otros secundarios como glicerina, aldehído, ácido acético, ácido succínico, butilenglicol y acetona (Arguendas, 2013). Las materias primas más importantes de la fermentación son productos agrícolas y forestales que contienen una proporción de carbohidratos, tales como: los cereales (el maíz, el arroz, y el trigo), los tubérculos (papa) y los tallos (caña de azúcar). La selección de ellos dependerá de la bebida que se desea elaborar (Ham, 2016).

SAGARPA, (2017) menciona que en México en 2016, el 2% de maíz amarillo y el 52% de maíz blanco se destinó a consumo humano, primordialmente en tortilla, convirtiéndolo en la principal fuente calórica (CEDRSSA, 2015), ya que provee 38.8% de las proteínas, 49.1% del calcio de la dieta diaria de la población de México (Rangel, 2004). La tortilla es definida como pan plano sin levadura, la superficie no debe ser porosa, debe tener suficiente humedad para recalentarse y mantenerse flexible, ya que las tortillas de baja humedad se hacen rígidas. La tortilla en general, después de enfriarse pierde humedad, en virtud de la pérdida de gomas naturales durante el proceso de nixtamalización.; esto representa el 28% de mermas de acuerdo con el Informe Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en México del Banco Mundial (Ortega, 2017).

Las enzimas son proteínas capaces de manipular a otras macromoléculas, llamadas sustratos (González, 2010). En la hidrólisis enzimática del almidón se utilizan enzimas tales como las amilasas las cuales ayudan a hacer disponibles

los azúcares presentes en los carbohidratos (Carrera, 2003).

Con este trabajo se propuso elaborar una bebida alcohólica fermentada en un bioreactor experimental tipo Batch, aprovechando las mermas de tortilla de maíz (*Zea mays*), empleando α -amilasa para la hidrólisis enzimáticas del almidón presente y así obtener azúcares fermentables. El escalamiento del proceso se realizó por la optimización de los resultados mediante la metodología de Superficie de Respuesta (RMS) para posteriormente realizar la cinética de fermentación por medio de análisis bioquímicos y fisicoquímicos, basados en normas y métodos reproducibles para la obtención de resultados.

Finalmente se identificaron los probables metabolitos tóxicos presentes en la bebida alcohólica fermentada a base de tortilla de maíz mediante determinaciones microbiológicas para descartar la presencia de hongos causantes de Aflatoxina B1.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta (RSM) central compuesto (CCD) rotatable ($\alpha= 1.41421$) que consiste en una factorial 2^k (donde $k = 2$ factores) con 4 puntos factoriales, 5 centrales, 4 axiales y 2 variables de respuesta: etanol y azúcares reductores. El diseño completo consistió en 26 corridas experimentales (Cuadro1), las variables predictores fueron los sólidos totales ($^{\circ}$ Brix) y la cantidad de inóculo.

La metodología de superficie de respuesta fue seleccionada para obtener los modelos matemáticos que describen los efectos de los factores principales y sus interacciones y la variable de respuesta, de esta manera buscar la optimización para el escalamiento. Los datos experimentales fueron analizados a través del sistema estadístico Design Expert® v 10.0.0 de

Stat-Ease, Inc. (2016), las pruebas F y R^2 para el modelo de regresión.

Cuadro 1. Diseño de experimentos de la fermentación.

RunOrder	Grados Brix	Inóculo g/L
1	23	2.5
2	37	4
3	25	0.3
4	23.5	2.5
5	38	1
6	38	1
7	22	2.5
8	11	4
9	11	1
10	23	2.5
11	21	2.5
12	24	0.3
13	38	2.5
14	22	4.6
15	22	2.5
16	22	2.5
17	11	1
18	21	4.6
19	34	4
20	5	2.5
21	22	2.5
22	6	2.5
23	15	4
24	22	2.5
25	21	2.5
26	43	2.5

Caracterización fisicoquímica

Determinación de pH

La determinación de pH se determinó por medio de potenciometría con base a la NOM-F-317-S-1978 con ayuda de un potenciómetro calibrado, tomando muestras de cada formulación realizada. El resultado se obtuvo directamente de la observación en el potenciómetro.

Determinación de acidez titulable

Para llevar a cabo la determinación de acidez titulable en las corridas experimentales, se basó la NMX-F-102-S-1978, haciendo los cálculos correspondientes para obtener el resultado.

Cuantificación de Azúcares reductores

Para la determinación se empleó el método propuesto por Miller, 1959, usando un matraz aforado de 100 mL en el cual se agregaron 1.06 g de NaOH, 30g de tartrato de potasio, 1 g de DNS aforando con dH_2O y se almacenó en frasco ámbar a una temperatura de $4^{\circ}C$.

La curva de calibración se realizó preparando un stock de glucosa al 4% en un tubo de ensaye con 10 mL de agua destilada.

Las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 15 minutos y clarificadas pasando por una bureta de 50 mL con carbón activado. Cada muestra fue diluida 1/100 y se adicionaron 500 μL de DNS, se calentaron a ebullición por 5 min, se enfriaron a chorro de agua, se adicionaron 5 mL de H_2O y se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10S uv-vis) a 540 nm.

Cuantificación de etanol

Se tomaron 10 mL de mosto y se centrifugaron a 5,000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sedimento y se trabajó con el sobrenadante clarificado con una filtración en un embudo empaquetado con carbón activado (solución a).

La cuantificación del etanol producido se llevó a cabo por el método colorimétrico del dicromato de potasio descrito por Tello-Hinojosa *et ál.* (2005) que consistió en depositar 4 mL de una solución antioxidante (mezcla formada por 4.165 g de dicromato de potasio y 250 mL de ácido sulfúrico, aforando con agua destilada a 1000 mL) en tubos de ensayo, se adicionaron gota a gota 2 mL de la solución saturada de potasio hasta finalizado el burbujeo (solución b).

Se mezclaron 2 mL de la solución (a) con 2 mL de solución (b) homogenizándose de manera cuidadosa; seguido de esto se calentó a baño maría a una temperatura de $80 - 85^{\circ}C$ por espacio de 30 min. Se enfrió a temperatura

ambiente y se realizó la lectura en espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10S uv-vis) a 440 nm.

Para la estandarización del método se hizo el blanco y la curva patrón trazada a partir de estándares de etanol.

Determinación de la densidad de líquidos con el picnómetro de Gay-Lussac

Se determinó la masa m_0 del picnómetro vacío y seco, después se llenó el picnómetro con agua hasta un tercio del esmerilado dejando escapar las burbujas de aire se colocó el tapón y se secó el agua que salga por el orificio. Seguido se llenó el orificio hasta la parte superior, posteriormente se determinó la masa m_1 del picnómetro lleno de agua, se leyó la temperatura ϑ del agua y se extrajo la densidad del agua del cuadro 2.

Para determinar m_2 se volvió a llenar el picnómetro con el fermento hasta un tercio del esmerilado dejando escapar las burbujas de aire, se colocó el tapón con cuidado y se secó el sobrante que salió por el orificio.

Cuadro 2. Valores de la densidad ρ para el agua pura en función de la temperatura.

ϑ	$\rho / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	ϑ	$\rho / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
17°C	0.998775	25°C	0.997047
18°C	0.998596	26°C	0.996785
19°C	0.998406	27°C	0.996515
20°C	0.998205	28°C	0.996235
21°C	0.997994	29°C	0.995946
22°C	0.997772	30°C	0.995649

Posteriormente se determinó la densidad del líquido aplicando la Ec. 1:

$$\rho = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \quad (1)$$

Cuantificación de biomasa

Se tomó 1 mL de la muestra y se depositó en un tubo de ensayo en dilución a la 10^{-2} , se mezcló

homogéneamente y se adicionaron unas gotas en la cámara de Neubauer con escala de 0.0025 mm^2 colocando un cubreobjetos sobre dicha cámara en la zona cuadrática el centro de la cámara.

Una vez que la muestra está en la cámara de Neubauer, se enfocó la cuadrícula a 40x en un microscopio (Marca: Motic).

La cuantificación se realizó mediante la ecuación 2 para obtener células/mL.

$$\text{Células/mL} : 10,000 \times 5 \times 10 \times A \quad (2)$$

Dónde:

A: Número de células contadas en los 5 cuadrantes.

Determinación de microorganismo productor de Aflatoxina B1

Para la determinación de hongos productores de aflatoxina B1 en tortillas de maíz se utilizó la NOM-111-SSA1-1994. Para la preparación de la muestra se pesaron 10 g como lo indica la NOM-110-SSA1-199, se homogenizó de forma aséptica y se tomó 1 mL del sobrenadante, se realizaron las diluciones 1×10^{-5} en tubos de ensaye, de los cuales se tomó 1 mL de muestra y se vertieron en cajas Petri previamente esterilizadas por duplicado, se acidificó el medio PDA y se vertió en las cajas Petri con muestra, se dejó gelificar y se incubaron a 25 °C durante 5 días.

La expresión de resultados fue interpretada de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994 que señala ausencia de mohos como levaduras.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de fermentación

En la Cuadro 1 se muestran los datos experimentales, los cuales fueron analizados a través del sistema estadístico en 26 muestras, de los que se obtuvo por medio de la optimización los valores para llegar al máximo consumo de Azúcares Reductores y que a su vez nos

proporcionara una alta producción de alcohol. Como resultado se obtuvo que la más óptima formulación para escalamiento sea de 2.5 g/L de Inóculo a 25 °Brix.

Acidez y pH

De acuerdo a lo postulado por Machín, *et al.* 2016, el pH óptimo para el crecimiento de levaduras productoras de alcohol es de 3.5 a 5, en el cual las levaduras son capaces de soportar medios ácidos para su producción. En la figura 1 se muestra el comportamiento de pH, el cual disminuye de 6.8 hasta 4 permitiendo así la producción de alcohol por competencia con el sustrato.

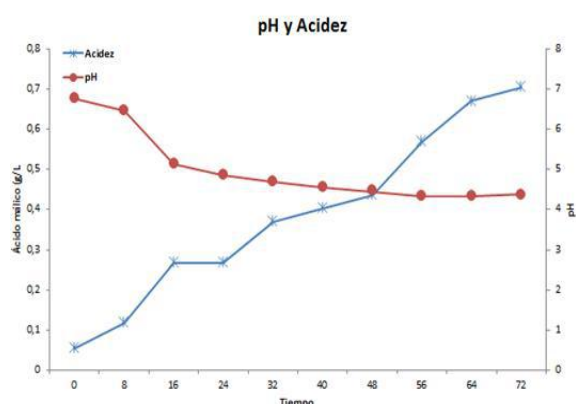


Figura 1. Comportamiento fisicoquímico de bebida a base de tortilla de maíz.

La normatividad para la clasificación de bebidas alcohólicas NOM-199-SCFI-2017 establece como contenido mínimo de alcohol 2% y como máximo 25% v/v para considerar a una bebida alcohólica como fermentada. Siendo así considerada a nuestra bebida por su contenido de alcohol de 22.70% v/v. El comportamiento de la producción de alcohol fue de acuerdo a lo postulado por Peña y Arango, 2009, donde hace mención que cuando hay una menor concentración de azúcares hay un incremento en la producción de etanol, y se puede confirmar que durante las 72 h de fermentación los azúcares reductores disminuyeron considerablemente de 4.59 g/L iniciales a 2.8 g/L finales, y el alcohol aumentó hasta 22.7% junto con el crecimiento de células obteniendo un valor final de 3.30E+07 células/mL.

Parámetros Cinéticos

En el Cuadro 4 se muestran los resultados de los principales parámetros cinéticos de fermentación, teniendo una velocidad específica de crecimiento de 0.111 h⁻¹, tiempo de duplicación de 2.88 h, rendimiento producto/sustrato de 12.67%, velocidad máxima de crecimiento (Vmax) 0.40 h⁻¹ y constante de consumo de sustrato de 2.9761 h⁻¹ (Ks). La afinidad de la levadura por el hidrolizado de tortilla es muy baja (2.97 h⁻¹), y esto se debe a que la mayor parte de los carbohidratos de la tortilla no se hidrolizaron completamente, sin embargo, la tortilla se puede usar para producir alcohol. La figura 2 muestra el comportamiento cinético de la fermentación, en la cual se puede observar que el comportamiento de la producción máxima de alcohol se da a las 24 h de la fermentación.

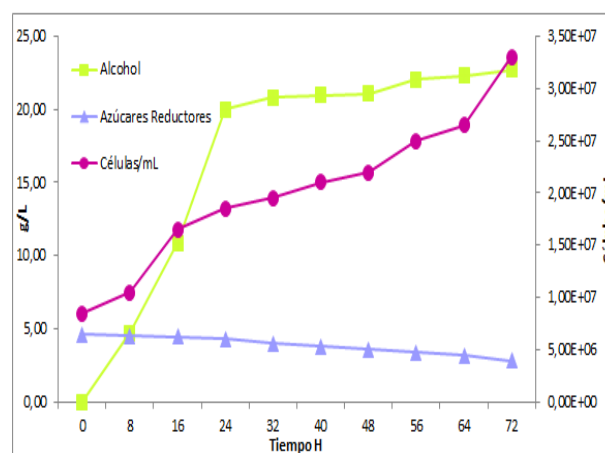


Figura 2. Comportamiento cinético de la fermentación con respecto a la biomasa, alcohol y azúcares reductores.

Cuadro 4. Parámetros Cinéticos de la fermentación.

Parámetro	Producto	Sustrato	μ	td	Yp/s
Vmax (mg/s)	0.4080	0.0111	0.1121	2.8815	12.6772
K	6.7058	2.9761	-	-	-

La figura 3 muestra la velocidad de reacción como una función de la concentración del

sustrato, en donde se determina la velocidad de reacción inicial V_0 desde el momento de combinar el sustrato y la enzima (*Saccharomyces cerevisiae*). Mediante la linealización de los datos por la ecuación de Lineweaver Burk, se obtuvo una constante de formación de producto (K_p) de 6.7058 h^{-1} y una constante de formación de sustrato (K_s) de 2.9761 h^{-1} con un valor de coeficiente de determinación para la variable de respuesta: alcohol $R^2=0.9367$ y para la variable de respuesta sustrato $R^2=0.5426$.

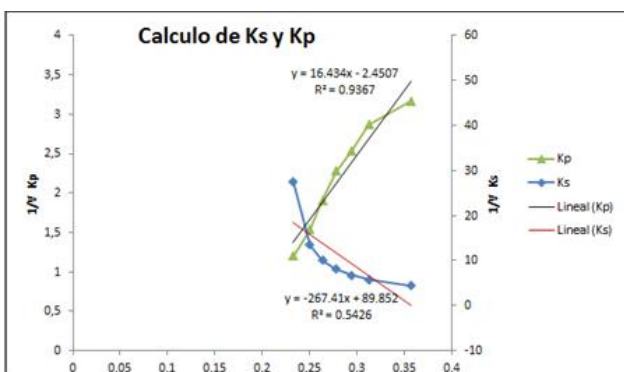


Figura 3. Gráfico Lineweaver Burk de sustrato y producto.

Determinación de aflatoxinas

La nixtamalización del maíz transforma hasta el 90% de las aflatoxinas en los metabolitos tóxicos B2a y G2a (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007) y debido a esto, se decidió determinar y cuantificar la presencia de estos hongos. La norma oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996 señala que la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de mohos es de 1000 UFC/g en harina nixtamalizada de maíz.

Los resultados mostraron que la tortilla usada para la elaboración de este producto, no tuvo presencia de hongos, por lo que resulta improbable la presencia de Aflatoxinas.

La expresión de resultados fue interpretada de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994, y se muestra la ausencia de hongos en las placas con agar de dextrosa y papa .

IV. CONCLUSIONES

Se obtuvo una bebida Alcohólica fermentada utilizando como materia la tortilla de Maíz (*Zea mays*) de la región de Tehuacán con un contenido de alcohol de 22.7%.

Se generó una posible solución para el uso de las mermas de las tortillerías en la zona de Tehuacán y a sus alrededores.

La bebida fermentada a base de tortilla de maíz, no tuvo presencia de hongos productores de aflatoxinas, por lo que es una bebida inocua para su consumo.

V. REFERENCIAS

- Abbas HK, Weaver MA, Horn BW, Carbone I, Monacell JT, and Shier WT. 2011b. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews* 30:59-70.
- Arguendas.P. (2013). Definición del proceso de elaboración de una bebida fermentada. 26/03/2019, de Tecnología en Marcha Sitio web: file:///C:/Users/Hernandez/Downloads
- Arnáiz, C.,Isac,L. y Lebrato,J. (2000, Octubre). Determinación de biomasa en procesos biológicos. *Tecnología del agua*, 205, 45-52.
- Arrúa,A.. (2009). Caracterización morfológica y toxigénica de cepas de *Aspergillus flavus* Link Fr. Y DE *Aspergillus parasiticus* Speare, aisladas de grano de maíz proveniente de 14 estados de la república. Marzo 18,2019. Sitio web: <http://repositorio.uaaan.mx>
- Bailey, R. H., Clement, B. A., Chase, T. A., Phillips, T. D. 1991. "The Distribution of Aflatoxins in the Production of Corn Tortillas". *Toxicologist* 11: 280.
- Brandt M. (2010).Inhibition Kinetics (Cinética inhibitoria).8 de Abril de 2019.CHEM

- 330 biochemistry website. Sitio Web: www.rose-hulman.edu
- Schoo Sitio web: <https://www.redalyc.org>
- Carretero.F. (2013). Innovación tecnología en la industria de bebidas. Obtenido de procesos de fabricación de bebidas alcohólicas: <https://upcommons.upc.edu>
- Jorge Eliécer Carrera 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de ciencias agropecuarias. Vol 1. No. 1.
- CEDRSSA, (2015). Reportes del CEDRSSA Vol. II. Recuperado de: <http://amerac.org>
- Maggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriol Rev 1977; 41: 822-55. (Maggon KK, Gupta SK, Venkitasubramanian TA.,1977)
- Ciegler, A. Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity. Lloydia 1975; 38: 21-35.
- Mirocha C, Pathre S, Christensen, C. Micotoxins: Economic microbiology. London: Academic Press, 1979: 468-83.
- De Arriola, M. C., de Porres, E., de Cabrera, S., de Zepeda, M. Rolz, C. 1988. "Aflatoxin Fate During Alkaline Cooking of Corn For Tortilla Preparation". J. Agric. Food Chem. 36: 530-553.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas.
- González. (2010). Cinética enzimática. 26/03/2019, de Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB, investigador Unidad Biotecnología Vegetal Sitio web: <http://www.scielo.org.co>
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Graü de Marín, C., Muñoz, D., Márquez, E., Figueroa, G. ,Maza, J.. (Mayo-Junio, 2011). Identificación de hongos con potencial micotoxigénico en harinas de pescado destinadas para la elaboración de alimentos concentrados. Revista Científica, XXI, 256-264.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996, bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, semolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, semolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
- Ham. K. (2016). Análisis fisicoquímico, sensorial y respuesta a estrés en levaduras durante la elaboración de un vino artesanal. 25/03/2019, de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos Sitio web: <http://www.fcb.uanl.mx>
- Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017 Bebidas alcohólicas-denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.Norma Oficial Mexicana NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos.
- Hernandez.I. (2015). ESTUDIO CINÉTICO ENZIMÁTICO DE LA HIDROLASA A PARTIR DE CÍTRICOS. 25/03/2019, de Executive Business
- Ortega, Omar, (08 de diciembre de 2017). Mexicanos desperdician 3 de cada 10 tortillas. EL FINANCIERO. Recuperado de: <https://www.elfinanciero.com.mx>

Peña C., Arango R. (2009). Evaluation of ethanol production using recombinant strains of *saccharomyces cerevisiae* from sugar cane molasses. 28 de Marzo de 2019, de SCielo Sitio web: <http://www.scielo.org.co>

Rangel. E. (2004). Nixtamalización, elaboración y calidad de tortilla de maíces de Ecatlán, Puebla, México. 25/03/2019, de Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. Sitio web: <https://www.colpos.mx>

SAGARPA, (2017). PLANEACION AGRICOLA NACIONAL 2017-2030. Recuperado de: <https://www.gob.mx>

Zakhia-Rozis, N.; Catalá, A.; Soriano, J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Trazabilidad y descontaminación / detoxificación de las micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 119 al 132.