

## **FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA ALCOHÓLICA FERMENTADA A BASE DE MERMAS DE PAN DULCE FORMULATION OF AN ALCOHOLIC BEVERAGE BASED ON BREAD MASSES**

Bravo-Delgado, H. R.<sup>1</sup>, Amaro-Moreno, M. F.<sup>1</sup>, Andrade-García, S.<sup>1</sup>, Gil-Aguilar B. A.<sup>1</sup>, Negrellos-Amador, Raquel, Rodríguez-Antonio, L. C.<sup>1</sup>, Vázquez-Gálvez, P.<sup>1</sup>, Franco-Popoca, F.\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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. \* fpopoca@gmail.com

### **Resumen**

El Pan dulce es uno de los principales alimentos de la dieta de la población mexicana, por lo que su producción diaria genera la acumulación de merma que no es aprovechada y se desecha. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo darle un valor agregado a la merma de pan dulce, para lo cual se realizó una bebida fermentada aprovechando toda la azúcar que se disponía. Se realizó un diseño de experimentos factorial 2<sup>k</sup> usando como factores la cantidad de pan dulce y la concentración de levadura. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue de 17 °Brix y 4.6 g/L de levadura, así mismo, se escaló a un bioreactor piloto de 19 L de capacidad y se realizó una cinética de fermentación midiendo cada 8 h 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 9.4% alc. Vol., que de acuerdo a la NOM-142-SSA1/SCFI-2014 se encuentra bajo la clasificación como bebida de contenido alcohólico alto.

Palabras clave: Fermentación, mermas de pan dulce, Hidrólisis.

### **Abstract**

Sweet Bread is one of the main foods of the Mexican population's diet, so its daily production generates the accumulation of waste that is not used and discarded. Therefore, the present study aimed to give added value to the decrease in sweet bread, for which a fermented drink was made taking advantage of all the sugar that was available. A 2<sup>k</sup> factorial experiment design was carried out using as factors the amount of sweet bread and the concentration of yeast. The results showed that the best treatment was 17 ° Brix and 4.6 g / L of yeast, likewise, it was scaled to a pilot bioreactor with a capacity of 19 L and a fermentation kinetics was performed measuring every 8 h for a period of 72 h reducing sugars, ° Brix, ethanol, density, acidity, pH, biomass and quantification of acetaldehydes. A product with ethanol content of 9.4% alc. Vol., was obtained, which according to NOM-142-SSA1 / SCFI-2014 is classified as a high alcoholic beverage.

**Key words:** Fermentation, Sweet bread losses, Hydrolysis.

---

1\* Autor responsable

Recibido: Mayo 2019. Aceptado: Agosto 2019

Publicado como ARTÍCULO en la Revista Tecnológica Agrobioalimentaria 3(1): 18-24, 2019, ISSN 2395-8332

## I. INTRODUCCIÓN

La panadería “la Luz” ubicada en Zapotitlán Salinas Puebla, tiene una producción promedio de 2500 piezas de pan al día, de las cuales se tiene una merma de 50 a 100 piezas de pan por día. En el presente estudio se presenta una propuesta de innovación, tomando como iniciativa la fermentación de mermas de pan dulce, para dar un valor agregado al producto y generar nuevas fuentes de ingresos económicos para los productores de pan.

Desde un punto de vista estrictamente químico, la fermentación panaria no es diferente de la fermentación alcohólica del vino o de la cerveza, aunque en la práctica presenta caracteres distintivos que justifican su estudio particular (García, 2015).

En general un azúcar reductor (glucosa o la fructosa), sirven como sustratos para la levadura, produciendo metabolitos secundarios importantes para la industria alimentaria, como el etanol; sin embargo, uno de los problemas principales por lo cual no se ha usado la merma de pan dulce para la producción de alcohol, es la complejidad de los carbohidratos (almidones) presentes. Para solucionar este problema, se usaron  $\alpha$ -amilasas para hidrolizar las amilosas presentes en el almidón y obtener azúcares simples que se puedan fermentar.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Se aplicó la metodología de Superficie de Respuesta (RSM), para obtener la formulación óptima del proceso de fermentado de las mermas de pan dulce, aplicando el criterio de selección la mayor producción de etanol y mayor cantidad de azúcares consumidos. En la Tabla 1 se muestran los factores y niveles utilizados en el proceso. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza por la prueba de TUKEY ( $P < 0.05$ ), mediante el programa estadístico Minitab®17.

Tabla 1. Diseño experimental factorial  $2^K$  para la selección del mejor tratamiento en la fermentación de las mermas de pan dulce.

Núm. De experimento	°Brix	Inóculo g/L
1	15	2.5
2	10	1
3	20	4
4	15	2.5
5	15	4.62
6	15	4.62
7	22.07	2.5
8	7.92	2.5
9	15	2.5
10	20	1
11	22.07	2.5
12	15	0.37
13	20	4
14	10	4
15	10	4
16	15	2.5
17	15	2.5
18	15	0.37
19	15	2.5
20	15	2.5
21	15	2.5
22	10	1
23	15	2.5
24	15	2.5
25	7.92	2.5
26	20	1

### *Proceso de fermentación*

En la Figura 1 se muestran las operaciones unitarias a las que se sometieron los tratamientos. La fermentación se realizó en un biorreactor de 19 L de capacidad en condiciones anaerobias, en el cual se mantuvo la temperatura a 25 °C y agitación a 50 rpm durante 72 horas.

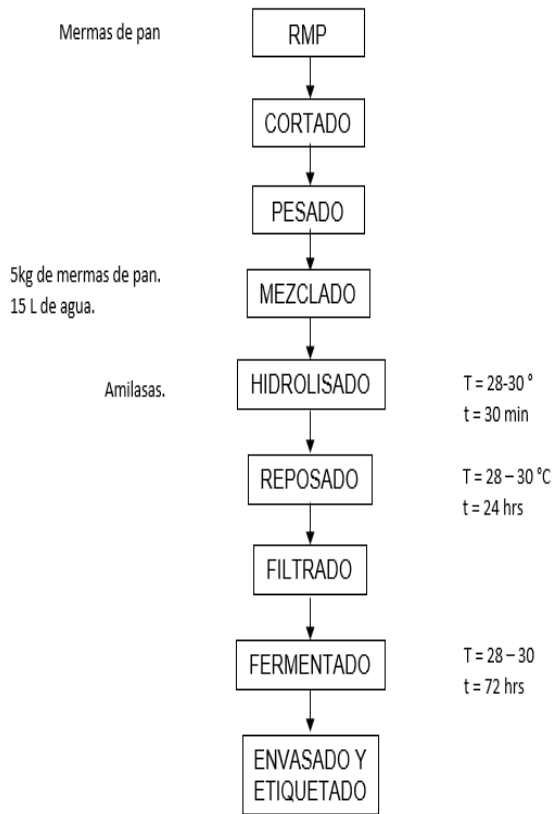


Figura 1. Diagrama de bloques del proceso de fermentación.

### Clarificación de la muestra

De las muestras fermentadas se tomaron aproximadamente 30 mL de mosto, se filtraron en una bureta de 50 mL empacada con carbón activado y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min en una centrifuga (Hernle Labnet modelo Z 326). Se trabajó con el sobrenadante con el fin de que no altere el color de las muestras en las determinaciones.

### Determinación de azúcares reductores por el método DNS (Ácido- 3,5-dinitro salicílico)

Se realizó la determinación de azúcares reductores utilizando el método espectrofotométrico propuesto por Miller (1959). Se preparó el reactivo DNS, disolviendo 0.8 g de NaOH en 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada, se agregó 15 g de tartrato de sodio-potasio tetra hidratado y 0.5 g de DNS (ácido-3,5-

dinitrosalisílico), se mezcló y se aforó con dH<sub>2</sub>O en un matraz aforado (Kymax®) de 50 mL, posteriormente se guardó en un frasco ámbar a 4°C para su uso. Se realizó una curva de calibración usando 0.5 mL de un patrón de glucosa al 0.4% (Sigma Aldrich, USA) y 0.5 mL de reactivo DNS. Se calentaron a ebullición durante 5 min, posteriormente los tubos se enfriaron a chorro de agua y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente. Por ultimo a cada tubo se agregaron 5 mL de H<sub>2</sub>O y la lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10S uv-vis) a 540 nm.

### Cuantificación de producción de etanol por el método colorimétrico del dicromato de potasio

#### Preparación de soluciones

De acuerdo con lo descrito por Oviedo *et al.*, (2009), se preparó una solución oxidante la cual consistió en una mezcla formada por 4.165 g de dicromato de potasio y 250 mL de ácido sulfúrico y posteriormente se aforó con agua destilada a 1 L (solución b), se preparó una solución saturada de carbonato de potasio (reactivo grado técnico, solución c). En tubos de ensayo se adicionaron 4 mL de la solución b y 2 mL de la solución c, esto gota a gota hasta que finalizó el burbugeo (solución d).

#### Cuantificación de etanol

En tubos de ensayo de 16 mL se agregaron 2 mL de la solución a (muestra clarificada) y 2 mL de la solución d, se calentaron en baño María a temperatura entre 80 y 90°C durante 20 min, después del tiempo transcurrido se enfriaron a chorro de agua fría. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Genesys 10S uv-vis) a 440 nm.

#### Determinación de densidad

La densidad se determinó por el método gravimétrico de balanza y probeta, de acuerdo con OIML, (2011), se colocó una probeta de vidrio (Marca: Kimax) de 10 mL en el platillo de una balanza analítica (Marca: OHAUS P4214) y se taró.

Posteriormente se agregó 10 mL de cada una de las corridas experimentales y se obtuvo el peso del líquido. La densidad se calculó mediante la ecuación 1.

$$\rho = \frac{\text{peso (g)}}{\text{volumen (mL)}} \quad \text{EC. (1)}$$

### Determinación de pH

De acuerdo con la NMX-F-317-S-1978, el pH se determinó por el método potenciométrico mediante un potenciómetro calibrado (Marca: HANNA). Se usaron 20 mL de cada una de las corridas experimentales en un vaso de precipitado, en el que se sumergió el electrodo del potenciómetro hasta obtener la lectura de cada muestra por triplicado.

### Determinación de °Brix

De acuerdo a la NMX-F-103-1982, se utilizó el método de la refractometría, utilizando un refractómetro (Marca: Atago) con escalas de 0-30 y de 30-60; se tomó una gota de cada muestra experimental y se colocó en la cámara del refractómetro, obteniendo el resultado de manera ocular por triplicado.

### Determinación de acidez

Se tomaron los fundamentos de la NMX-F-102-S-1978 para la obtención y tratamiento de la muestra. Se midió 20 mL de cada corrida experimental y como indicador se adicionó 3 gotas de fenolftaleína, posteriormente se tituló con NaOH 0.1N y se calculó mediante la ecuación 2.

$$\% \text{Ácido} = \left[ \left( \frac{f \cdot v \cdot N}{w} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{EC. (2)}$$

Donde:

f: Factor del ácido (0.058)

v: Volumen titulado de NaOH (mL)

N: Normalidad (0.1N)

W: Peso de la muestra (g)

### Determinación de biomasa

Se realizó por el método microscópico descrito por Aguilar *et al.*, (2015). De las muestras obtenidas

cada 8 horas, se tomó una gota y se colocó en una cámara de Neubauer, se contaron las células en los cuadros de color rojo como se observan en la Figura 2, primero con el objetivo de 10x para enfocar toda la cuadrícula y posteriormente con el de 40x en un microscopio (Marca: Motic). La cuantificación se realizó mediante la ecuación 3 para obtener células/mL.

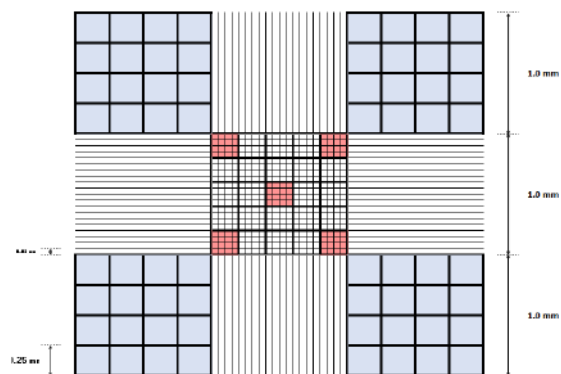


Figura 2. Dibujo de las celdas de una cámara de Neubauer. Fuente: Gómez (2018).

$$\text{Células/mL} : 10,000 \times 5 \times 10 \times A \quad \text{EC. (3)}$$

Dónde:

A: Número de células contadas en los 5 cuadrantes.

### Determinación de acetaldehído

Utilizando la NOM-142-SSA1-1995 se determinó acetaldehído en el producto final. Se destilaron 50 mL de la muestra de acuerdo con la NMX-V-013-S-1980; se tomaron 5 mL de la muestra destilada en un matraz Erlenmeyer (Kymax®) de 250 mL, se mezcló con 5 mL de agua destilada y 1 mL de disolución de bisulfito de sodio 0.05N. Se realizó un testigo colocando en un matraz Erlenmeyer (Kymax®) de 250 mL 10 mL de agua destilada se agregó 1 mL de bisulfito de sodio al 0.05N. Las muestras y el testigo se dejaron reposando 30 min. Se realizó una titulación utilizando como indicador una disolución de almidón y como titulante tiosulfato de sodio y se calculó de acuerdo a la fórmula descrita en la NOM-142-SSA1-1995.

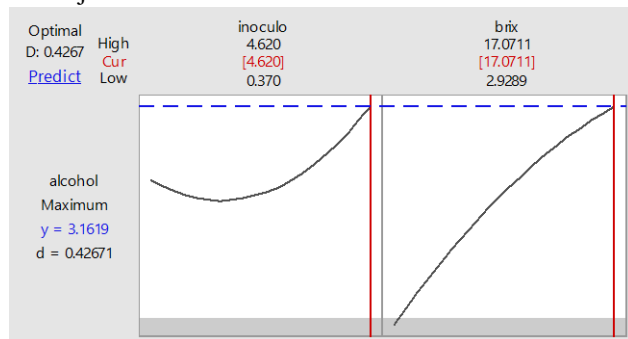
### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Diseño experimental óptimo

El diseño experimental de Superficie de Respuesta (RSM) realizado con Minitab® 17, constó de 26 tratamientos donde la cantidad de inoculo y °Brix varían de acuerdo a cada tratamiento como se muestra en la Tabla 1.

La Figura 3 muestra la optimización de los mejores tratamientos para obtener la cantidad de inoculo de 4.62 g7L con 17.07 °Brix el cual se utilizó para el escalamiento a bioreactor de 19 L de capacidad.

Figura 3. Gráfica de resultados para la optimización de los mejores tratamientos.



#### Cinética de fermentación

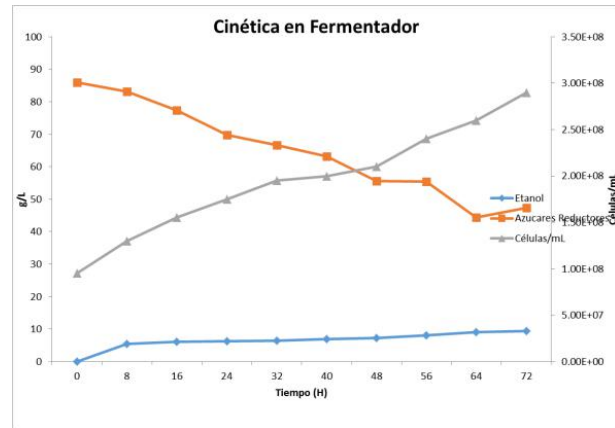
En la Tabla 2 se observa el comportamiento cinético de la fermentación del mejor tratamiento en bioreactor. La fermentación se realizó durante 72 h, y se obtuvieron muestras cada 8 h, teniendo un total de 9 muestras. La fermentación en bioreactor muestra un comportamiento constante después de las 72 h, por lo cual se tomó como tiempo máximo de la fermentación.

Tabla 2. Comportamiento cinético de la fermentación por 72 h.

muestra	tiempo	Densidad	°Brix	Azúcares Reductores (Abs)	Alcohol (Abs)	AR	°GL -1
0	0	1.080	36.0	0.4	0.28	4.7	0.0
1	6	1.082	34.5	0.3	0.224	4.0	6.6
2	12	1.082	32.5	0.3	0.224	3.6	6.6
3	18	1.086	32.0	0.3	0.207	3.5	9.7
4	24	1.088	31.5	0.3	0.205	3.5	10.0
5	30	1.089	31.0	0.3	0.197	3.3	11.4
6	36	1.091	30.5	0.2	0.193	3.3	12.2
7	42	1.092	30.0	0.2	0.189	3.1	12.9
8	48	1.094	30.0	0.2	0.185	3.1	14.4
9	54	1.110	29.0	0.2	0.18	3.0	16.3
10	60	1.120	29.0	0.2	0.17	2.9	20.0
11	66	1.122	29.0	0.2	0.167	2.8	21.2
12	72	1.136	28.5	0.2	0.16	2.7	23.8

En la figura 4 se observa el comportamiento de la cinética crecimiento de biomasa, producción de etanol y la disminución del contenido de sustrato durante la fermentación.

Figura 4. Gráfica de comportamiento cinético de la fermentación respecto a la biomasa, alcohol y azúcares reductores



De acuerdo a estudios realizados por Valdés *et al.*, 2015, la producción de etanol utilizando levadura *S. cerevisiae* es de 50.5 g/L a las 24 horas de la fermentación. En nuestro estudio, se reportó 23.8 g/L de etanol utilizando como sustrato el pan hidrolizado; sin embargo, se considera que es una buena alternativa para la producción de etanol debido al bajo precio que tiene la merma de pan.

En la Tabla 3, se observan los datos obtenidos de la fermentación, teniendo como resultado un 13.93% de alcohol, una duplicación del sustrato cada 0.09 horas y un rendimiento del 0.36%. La constante de consumo o constante de saturación de sustrato (Ks) tuvo un valor de 0.02 h<sup>-1</sup>, lo cual indica una gran afinidad de la levadura por la merma de pan hidrolizado como sustrato. La velocidad máxima de crecimiento (Vmax) es de 1.31 h<sup>-1</sup>, lo cual indica que la levadura requiere mucho tiempo para poder fermentar los azúcares del pan hidrolizado.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la fermentación

Parámetro cinético	Valor
μ	0.09 h <sup>-1</sup>
td	3.09 h
Ks	0.02 h <sup>-1</sup>
Vmax	1.31 h <sup>-1</sup>
Yp/s	0.36 °GL/g de sustrato
P <sub>f</sub>	13.92 °GL

*Análisis fisicoquímicos y toxicológicos de la bebida fermentada*

*Acidez vs pH*

En la gráfica de la figura 4, se observa el comportamiento fisicoquímico de la bebida, donde la acidez aumenta y el pH disminuye, teniendo un comportamiento normal de una fermentación alcohólica.

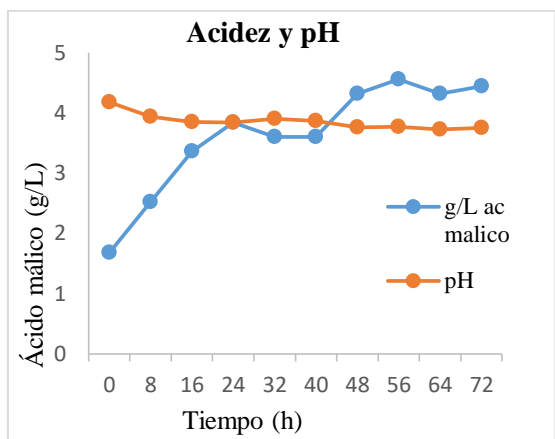


Figura 5. Comportamiento cinético de la fermentación (acidez y pH).

De acuerdo con Machín *et al.*, (2016), el pH óptimo en el cual se desarrollan mejor los microorganismos, oscila entre 3.5 y 5. Las levaduras tienen la ventaja de soportar medios ácidos por lo que el pH obtenido de la bebida fermentada permitió mantener el medio controlado de bacterias para competir por el sustrato, tal y como se observa en la curva de pH de la figura 4.

*Determinación de acetaldehído*

En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos tras la determinación de acetaldehído al producto final, por lo que el valor que se observa cumple con los rangos establecidos de acuerdo a la NOM-199-SCFI-2015.

Tabla 4. Análisis toxicológico

Valor obtenido	Límite máximo
11.70 mg/100mL de alcohol anhidro	40 mg/100mL de alcohol anhidro

El acetaldehído ha mostrado características mutagénicas y carcinogénicas en estudios

realizados *in vitro* e *in vivo* tanto en animales como en células. En estudios previos se ha comprobado que el daño ocurre con concentraciones estimadas de 40 a 1,000 µ/mL (Rivera *et al.*, 2016).

**IV. CONCLUSIÓN**

Las condiciones de optimización al mejor tratamiento para 19 L fue con 4.6 g de levadura y 17 °Brix. El producto fermentado de mermas de pan dulce hidrolizado, tuvo un contenido de etanol de 9.41%, misma que presento características aceptables por la NOM-142-SSA1-1995, además de ser inocuo para consumo humano por su baja cantidad de acetaldehído.

**V. REFERENCIAS**

Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J... Linares, G. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces Cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial Science*, 5(1), 37-47.

Casado, F. C. (2001). Proceso de fabricación de bebidas alcohólicas. *Innovación Tecnológica en la industria de bebidas*.

García, O. Francisco. (18 de Mayo de 2015). Papel de la fermentación en la fabricación del pan. Delegación para Sevilla y Provincia. Sección Técnica Recuperado.

Machín, C., Garrido, N., Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Cuba: ICIDCA.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *anal.chem.* 31: 426-428

MOHAMED M., A., & C. ADINARAYANA, R. (1986). Direct Fermentation of Potato Starch to Ethanol by Cocultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *APPLIED AND*

- ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1055-1059.
- NMX-F-102-S-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma mexicana. Dirección General de Normas.
- NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Foods. Fruits and derivatives. Determination of degrees brix. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-F-317-S. Alimentos para humanos. Determinación de pH. (Determinación de pH en alimentos).
- NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- NMX-V-005-S-1980. Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de ésteres y aldehídos.
- NMX-V-005-S-1980. Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de ésteres y aldehídos. Distillated alcoholic beverages. Determination of esters and aldehydes. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-V-013-S-1980. Bebidas Alcohólicas Destiladas. Determinación del por ciento de alcohol en volumen en la escala Gay-Lussac a 288 K (15°C). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. (Esta norma cancela a NOM-V-13-1970).
- NMX-V-016-1980. Bebidas Alcohólicas destiladas. Determinación de acidez total. Distilled alcoholic beverages. Determination of total acidity. Normas mexicanas. Dirección general de normas.
- Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-199-2015, Bebidas Alcohólicas-Denominación, Especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- OIML. (2011). Guía OIML G-14: Medición de densidad. Obtenido de OIML: <https://www.oiml.org/en/publications/other-language-translations/spanish/g014-es11.pdf>
- Oviedo, L., Lara, C., & Mizger, M. (2009). Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 1-7.