



Assessing the production parameters of a pulque-like beverage using a Composite Central Design (CCD) experiment

Establecimiento de los parámetros de producción de una bebida semejante a pulque utilizando un Diseño Compuesto Central (DCC)

Sergio Zavala-Castillo*, Rafael de Jesús Michel-Hernández, Luis Fernando Arteaga-López

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas (UPIIZ) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Ingeniería en Alimentos, Blvd. del Bote S/N Cerro del Gato Ejido La Escondida, Col. Ciudad Administrativa, C.P. 98160, Zacatecas, Zacatecas México.

*Corresponding author.

E-mail address: szcres@gmail.com (S. Zavala-Castillo).

Received: 1 January 2017 / Received in revised form: 31 May 2017 / Accepted: 17 June 2017 / Published online: 1 July 2017.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.244>

ABSTRACT

The fermentation of mead was carried out using pure cultures of 3 different microorganisms, obtaining a fermented drink with low viscosity when using *Saccharomyces cerevisiae*. Afterwards an experimental design was developed based on Central Composite Design (CCD) with Response Surface Methodology (RSM) to evaluate and optimize the effect of the addition of bee honey as well as fermentation time on final product. Viscosity, ethanol in distillate and final Brix grades were chosen as response variables. The experimental matrix had 12 treatments and from the values of the response variables the quadratic models were generated with determination coefficients (R^2) of 0.9375, 0.7688 and 0.6401 for viscosity, % (v/v) ethanol and Brix degrees, respectively.

Priority was given to the ethanol on the viscosity of the beverage. The optimum processing conditions were identified, with 70 hours for the fermentation time and 80 g / L for the honey concentration to obtain predicted values of 45% (V/V) of ethanol in the distillate and a viscosity of 4.14 cPs.

Keywords: Agave, Honey, Mead, Pulque, *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

Se llevó a cabo la fermentación de aguamiel utilizando cultivos puros de 3 diferentes microorganismos, obteniendo una bebida fermentada con baja viscosidad al utilizar *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente se desarrolló un diseño experimental basado en

el Diseño Compuesto Central (DCC) con la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) para evaluar y optimizar el efecto de la adición de miel de abeja, así como el tiempo de fermentación en el producto final. Las variables de respuesta seleccionadas fueron viscosidad, porcentaje (v/v) de etanol en el destilado y grados Brix finales. La matriz experimental tuvo 12 tratamientos y, a partir de los valores de las variables de respuesta, se generaron modelos cuadráticos con coeficientes de determinación (R^2) de 0.9375, 0.7688 y 0.6401 para la viscosidad, % etanol y grados Brix, respectivamente. Priorizando el contenido de etanol sobre la viscosidad de la bebida, se identificaron las condiciones óptimas de proceso, siendo estas de 70 horas para el tiempo de fermentación y 80 g/L para la concentración de miel, para obtener valores predichos de 45 % (v/v) de etanol en el destilado y una viscosidad de 4.14 cPs.

Palabras clave: Agave, Aguamiel, Miel, Pulque, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se produce por la fermentación anaeróbica de la savia azucarada (aguamiel) de agave. Tanto el pulque como el aguamiel son considerados bebidas funcionales ya que proveen de probióticos y prebióticos como la inulina. El pulque es de color blanco, con olor fuerte, viscoso y actualmente ha perdido popularidad en centros urbanos de México debido a que algunas variedades presentan viscosidad excesiva y su aroma tiende a ser repelente; sin embargo todavía es consumido en áreas desérticas del país donde el agua escasea (García-Garibay *et al.*, 1993). Algunos de los agaves se consideran especies amenazadas e incluso en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2001), y en el caso particular de *Agave salmiana*, especie cultivada en Zacatecas, los esfuerzos para mejorarla y conservarla no han sido totalmente fructíferos debido principalmente a la biología de su reproducción (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008). Por lo que el aprovechamiento sustentable del agave es prioritario y debe ser una opción a la elaboración tradicional de mezcal, tequila y ayate, pues no destruye la planta, sino que permite obtener productos útiles durante el ciclo de vida de la misma; en el caso de la fabricación artesanal de pulque se ha reportado que pueden obtenerse hasta 4 L diarios de aguamiel de una sola planta por un período de 6 meses (García-Garibay *et al.*, 1993). El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones experimentales para obtener una bebida fermentada semejante al pulque a partir de aguamiel de agave, adicionada con miel de abeja, que tenga una viscosidad reducida para hacerla atractiva a nuevos consumidores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Experimentos preliminares

El aguamiel se adquirió en Hacienda Nueva, municipio de Morelos, Zac. La miel proviene del municipio de Jerez, Zac. Se desarrolló un banco de cultivo de una muestra de pulque artesanal de San Luis Potosí y se utilizó pulque embotellado “La Flor Pura” como control. El aguamiel se pasteurizó a una temperatura de 80°C por un tiempo de 5 minutos e inmediatamente se enfrió en un baño de hielo hasta que la temperatura fue de 30°C. Se midieron grados Brix, índice de refracción, viscosidad y densidad al aguamiel crudo y al estabilizado térmicamente. Se realizó un experimento, sin utilizar miel, utilizando el banco de trabajo y tres cultivos puros procedentes de un cepario propio de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus sporogenes*.

2.2. Diseño Compuesto Central (DCC)

Los tratamientos, así como la miel, se esterilizaron en autoclave a 121.5 °C a una presión de 15 lb/in² por 15 minutos. Cada experimento se trabajó con un volumen de 250 mL de aguamiel estéril, 1.25 g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cantidad de miel calculada en la matriz. La incubación se llevó a cabo en una incubadora estática (modelo B-28, marca BINDER, Alemania) a una temperatura de 25 ±2 °C a los tiempos establecidos por la matriz.

La matriz de experimentación se desarrolló utilizando el software Design-Expert V6.0.8 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, U.S.A.) con el objeto de estudiar la influencia de dos factores, la cantidad de miel adicionada y el tiempo de fermentación, con tres niveles cada uno, el experimento seleccionado fue un DCC. La matriz generada cuenta con 12 experimentos, de los cuales 3 son replicas del punto central. A las formulaciones se les evaluaron la viscosidad (cPs), %(v/v) de etanol en el destilado y °Brix. La tabla 1 muestra los intervalos experimentales utilizados de concentración de miel y tiempo.

Tabla 1. Variables independientes (factores) y sus niveles usados en el DCC.

FACTOR	NIVELES CODIFICADOS				
	-1.414	-1	0	1	1.414
(A) Concentración de miel (g/L)	32.51	41	61.5	82	90.49
(B) Tiempo (horas)	14.06	24	48	72	81.94

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y los términos del modelo se consideraron significantes cuando el prob>f fuese menor que 0.05. La calidad del ajuste de la ecuación polinomial del modelo se expresó por medio del valor del coeficiente de determinación (R²). Los principales indicadores de la significancia y la adecuación del modelo utilizado incluyen la Precisión Adecuada, el valor de probabilidad (Prob>F) y el valor-F (relación de variación de Fisher). Mediante graficas de superficie de respuesta y graficas de contorno se determinaron las regiones optimas de las variables independientes y

como sus interacciones intervienen en las respuestas, adicionalmente utilizando la herramienta de Optimización numérica de Design Expert V6.0.8 se obtuvieron los valores óptimos de concentración de miel (g/L) y tiempo de fermentación (horas) para la maximización de % (v/v) de alcohol en el destilado y la minimización de viscosidad (cPs) de la bebida fermentada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Experimentos preliminares

El aguamiel utilizada para la producción de bebidas fermentadas en este trabajo presento un pH de 7.69, ligeramente superior al rango reportado de 4.5 a 7.5 (NMX-V-022-1972), sin embargo es un pH adecuado para transformarla a una bebida alcohólica fermentada pues indica que no se ha llevado a cabo una pre fermentación por la microbiota nativa que genere un “sabor” ácido en el producto final. También presentó un valor de sólidos solubles de 10.83 °Brix, el cual se encuentra dentro del rango de 7 a 17 reportado previamente (NMX-V-022-1972). Las variaciones en las características fisicoquímicas (composición) del aguamiel varían de acuerdo a la estación del año, la región de cultivo y la planta de la que se extrae (Sánchez-Marroquín, 1970). Se observó IR de 1.349 y viscosidad de 5.038 cPs. En la Tabla 2 se pueden observar algunos parámetros fisicoquímicos presentados por las bebidas fermentadas después de 24 horas de cultivo por diferentes microorganismos.

Tabla 2. Bebidas fermentadas con 24 h de cultivo.

Muestra	Viscosidad relativa	Bebidas fermentadas a las 24 horas de cultivo			
		pH	°Brix	Índice de Refracción	Densidad (g/cm ³)
Blanco (agua)	1.00±0.13	NM	NM	NM	1
PSBC	2.07±0.23	4.17	10.25	1.348	1.03
APSC	2.30±0.39	4.52	10.75	1.349	1.02
APLA	11.91± 0.13	4.4	10.75	1.349	1.03
APLE	38.37±0.53	4.56	NM	NM	NM

PSBC= Pulque con banco de trabajo; APSC= Aguamiel pasteurizado inoculado con *Saccharomyces cerevisiae*; APPLA= Aguamiel pasteurizada inoculada con *Lactobacillus acidophilus*; APLE= Aguamiel pasteurizado inoculado con *Lactobacillus sporogenes*; NM= no registrada.

Las bebidas fermentadas con *L. sporogenes* y *L. acidophilus* presentaron una alta viscosidad

relativa, de 38.37 y 11.91 respectivamente, mientras que la obtenida con *S. cerevisiae* presento una viscosidad ligeramente mayor a la bebida control, siendo de 2.30, por lo que se decidió continuar la matriz del DCC trabajando con *S. cerevisiae*, ya que además de presentar la menor viscosidad también es el microorganismo responsable de la producción de etanol. Además los productos de *Lactobacillus* mostraron consistencia cremosa y sabor agradable (datos no mostrados).

3.2. Diseño Compuesto Central (DCC) y Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

En la tabla 3 se presentan los datos obtenidos de viscosidad, etanol y grados °Brix de los doce tratamientos evaluados. El tratamiento 12 presentó la viscosidad más baja (3.403 cPs), en contraste con el tratamiento 7 que presentó 4.458 (cPs), siendo el tratamiento de mayor viscosidad. El mayor porcentaje de etanol en el destilado (40 %) se presentó en los tratamientos 2, 4 y 8. En la cuantificación de los sólidos solubles (°Brix) el tratamiento 5 obtuvo el menor valor, siendo de 4, mientras que los tratamientos 2, 4 y 7 presentaron 6 °Brix.

Tabla 3. Resultados de los parámetros fisicoquímicos de la matriz del DCC.

Tratamiento	No. de tratamiento	Factor 1 Concentración (g/L)	Factor 2 Tiempo de fermentación (h)	Respuesta 1 viscosidad (cPs)	Respuesta 2 % etanol (v/v)	Respuesta 3 ° Brix
1	1	41	24	4.408	20	5.75
2	6	82	24	3.98	40	6
3	5	41	72	3.877	30	5.5
4	3	82	72	4.146	40	6
5	2	33.51	48	3.682	33.33	4
6	12	90.49	48	4.079	40	5.5
7	7	61.5	14.06	4.458	30.2	6
8	11	61.5	81.94	4.04	40	5.25
9	9	61.5	48	3.584	20	5.25
10	8	61.5	48	3.416	20	5.5
11	10	61.5	48	3.422	30	5.5
12	4	61.5	48	3.403	30	5.5

Los datos de las tres respuestas analizadas se sometieron a análisis de varianza los cuales se muestran en las tablas 4, 5 y 6. El valor-f muestra la significancia de cada uno de los modelos y para el caso del modelo de la respuesta 1 (viscosidad) se obtuvo un valor-f de 18, lo que indica una adecuada significancia y adicionalmente se observa un Prob>f de solo 0.0015, es decir la probabilidad de que el valor-f de dicho modelo este dado por errores o ruido es solo del 0.15%.

Tabla 4. ANOVA para la variable viscosidad (cPs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado promedio	Valor de f	Prob > f
Modelo	1.44	5	0.29	18.00	0.0015
A	0.02	1	0.02	1.26	0.3039
B	0.11	1	0.11	7.13	0.0370
A ²	0.31	1	0.31	19.62	0.0044
B ²	1.05	1	1.05	65.82	0.0002
AB	0.12	1	0.12	7.58	0.0331
Residual	0.096	6	0.016		
Error puro	0.022	3	7.32E ⁻⁰³		

Dev. Est.= 0.13, R²= 0.9375, PRESS= 0.57, R² ajustada= 0.8854, Precisión adecuada= 10.959

Tabla 5. ANOVA para la variable % (v/v) de etanol.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado promedio	Valor de f	Prob> f
Modelo	741.90	5	148.39	3.99	0.0610
A	305.45	1	305.45	8.21	0.0286
B	143.31	1	143.31	3.85	0.0972
A ²	201.56	1	201.56	5.42	0.0588
B ²	149.27	1	149.27	4.01	0.0919
AB	00.00	1	00.00	0.00	1
Residual	223.07	6	37.18		
Error puro	100.00	3	33.33		

Dev. Est.= 6.10, R²= 0.7688, PRESS= 1052.91, R² ajustada= 0.5762, Precisión adecuada= 4.837

Tabla 6. ANOVA para la variable de ° Brix.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado promedio	Valor de f	Prob > f
Modelo	2.04	5	0.41	2.13	0.1915
A	1.03	1	1.03	5.40	0.0592
B	0.21	1	0.21	1.12	0.3297
A ²	0.23	1	0.023	1.18	0.3193
B ²	0.40	1	0.40	2.10	0.1979
AB	0.016	1	0.016	0.082	0.7844
Residual	1.15	6	0.19		
Error puro	0.047	3	0.016		

Dev. Est.= 0.44, R²= 0.6401, PRESS= 7.89, R² ajustada= 0.3402, Precisión adecuada= 5.225

Otro de los factores estadísticos importantes que indican la eficacia del modelo es R², el cual

permite conocer el grado de ajuste del modelo matemático. En este caso se obtuvieron valores de R^2 de 0.9375, 0.7688 y 0.6401, para los modelos de viscosidad, % etanol y °Brix respectivamente. Chauhan y Gupta (2004) así como Gutierrez & De la Vara (2008) remarcan la aceptación de cualquier modelo que presente $R^2 > 0.75$, por lo que los modelos para predecir la viscosidad y el % de etanol en las bebidas fermentadas que se elaboraron son adecuados, ya que ajustan el 93.75 y el 76.88% de la variabilidad.

La tabla 7 muestra los modelos matemáticos que predicen el porcentaje de alcohol, la viscosidad y los grados Brix en el espacio experimental especificado. En la predicción de la viscosidad el tiempo de fermentación presenta mayor efecto y de mayor significancia al presentar un $\text{Prob} > f$ de 0.0370 y 0.0002 para B y B^2 respectivamente (tabla 4), además en el modelo matemático el coeficiente de B^2 es el mayor de todos. Por su lado la interacción de la concentración de miel y el tiempo de fermentación ($A * B$) tienen poco efecto sobre el contenido alcohólico, al tener un coeficiente de $3.54167E-004$, mientras que A^2 presenta el mayor coeficiente del modelo predictivo (0.013355). Para el caso de la predicción de los grados Brix, se obtuvo R^2 de 0.6401, un valor $-f$ de 2.13 y un $\text{Prob} > f$ de 0.1915, cabe resaltar que esta medición permite cuantificar los sólidos solubles, por lo que podría verse interferido por azúcares no fermentables (fibra soluble e inulina principalmente) así como por biomasa, por lo que para conocer el comportamiento de el sustrato sería más adecuado evaluar los azúcares reductores en una cinética.

Tabla 7. Modelos matemáticos para la predicción de las variables de respuesta.

Respuesta	Ecuación descriptiva en factores reales
Viscosidad	$\text{Viscosidad} = 8.20799 - (0.079412 * A) - (0.094407 * B) + (5.27365E-004 * A^2) + (7.04644E-004 * B^2) + (3.54167E-004 * A * B)$
% etanol	$\% \text{ etanol} = 67.82881 - (1.34129 * A) - (0.62851 * B) + (0.013355 * A^2) + 8.38397E-003 * B^2 + (2.70786E-017 * A * B)$
°Brix	$\text{°Brix} = 4.37592 + (0.066289 * A) - (0.056306 * B) - (4.46163E-004 * A^2) + (4.34028E-004 * B^2) + (1.27033E-004 * A * B)$

A: Factor 1= Concentración de miel (g/L), B: Factor 2= Tiempo (horas)

La figura 1 muestra los valores experimentales (actual values) graficados contra los valores predichos (predicted values) por los modelos matemáticos. En el caso de la respuesta viscosidad, figura 1a, se observa congruencia entre los valores reales y los predichos al observar una baja dispersión de los valores con respecto al modelo. Respecto al % de etanol la gráfica 1b muestra una ligera dispersión de los valores reales respecto de los predichos por el modelo, estando en congruencia con el valor de R^2 reportado antes. La figura 1c muestra los valores experimentales de grados °Brix graficados contra los predichos por el modelo, observándose que no existe una tendencia lineal sino más bien un agrupamiento de datos en valores mayores a 5, un comportamiento semejante se ha observado en otras fermentaciones alcohólicas las cuales alcanzan su etapa final en valores de 4-5 grados °Brix (Acosta-Romero, 2012).

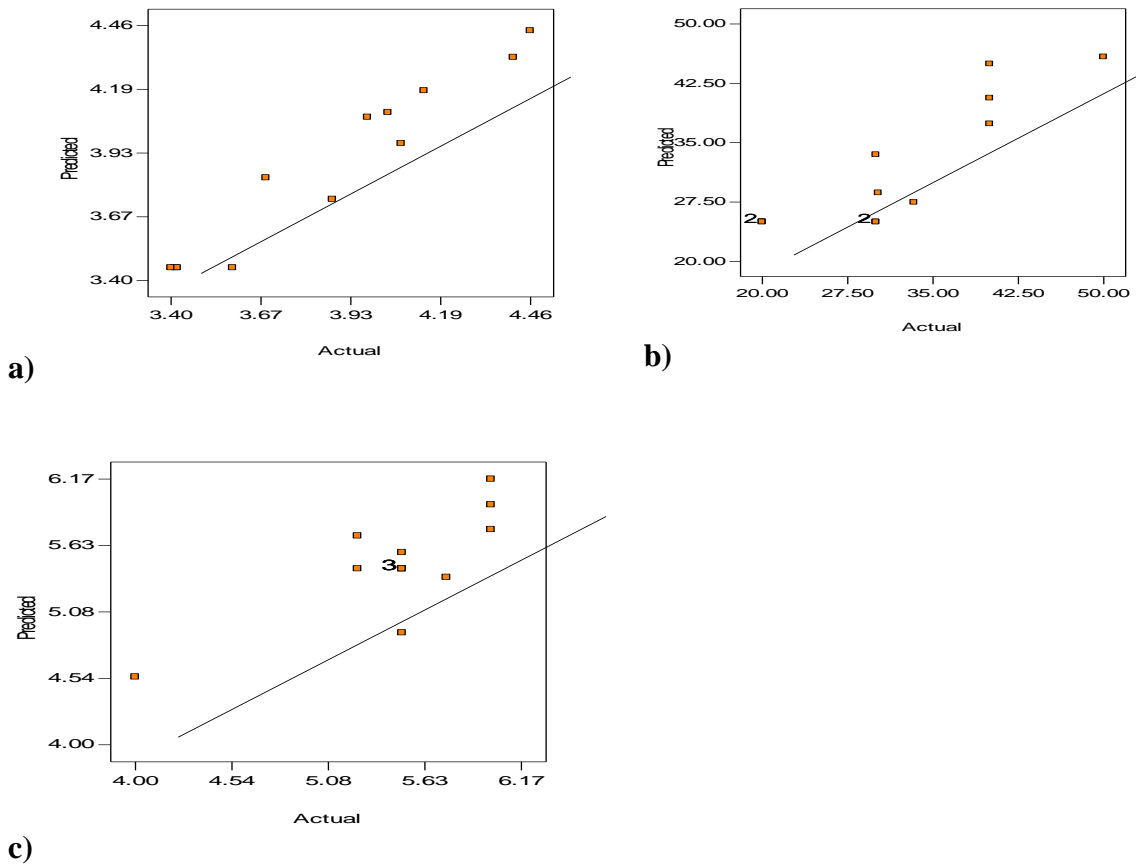
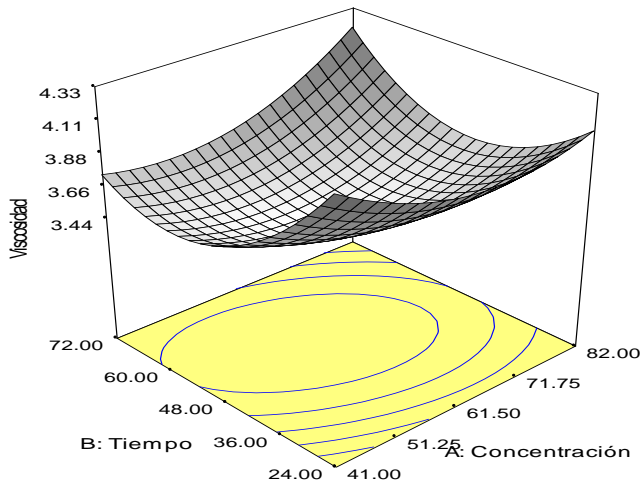
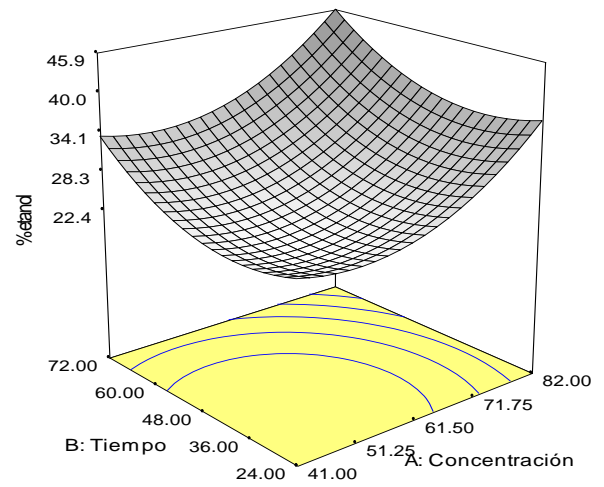


Fig. 1. Valores predichos (eje Y) contra reales (eje X); a) viscosidad, b) % (v/v) de etanol, c) °Brix.

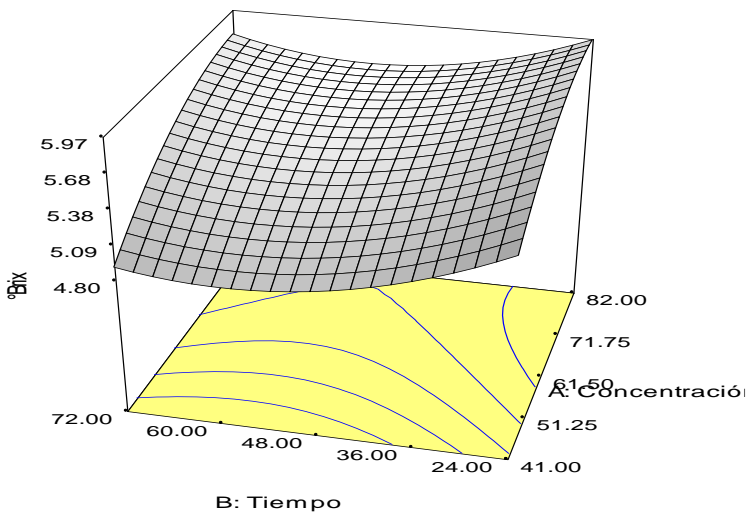
Con el fin de evaluar el efecto de los factores y sus interacciones en los valores de las respuestas evaluadas, se aplicó una metodología de superficie de respuesta (MSR), la cual se ilustra en forma de grafico de superficie de tres dimensiones en la figura 2. Se observa en la figura 2a que a tiempos intermedios de fermentación (35-55 horas) se obtienen los niveles más bajos de viscosidad, los cuales incrementan ligeramente con el aumento de la concentración de miel. La relación concentración-tiempo influye de manera proporcional en el contenido alcohólico de la bebida fermentada (figura 2b), observándose los mayores porcentajes de etanol en dos regiones. La primer región se da a máximos niveles de tiempo de fermentación (65-80 horas) en combinación de altos valores de concentración de miel (75-90 g/L), mientras que la segunda región se observa a bajos tiempos de fermentación en combinación de altas concentraciones de miel, siendo de 14 horas y 90 g/L respectivamente, por lo que la miel juega un papel importante en la producción de etanol. La figura 2c muestra la gráfica de superficie para los grados °Brix la cual muestra valores homogéneos no importando el tiempo o la concentración de miel.



a)



b)



c)

Fig. 2. Superficie de respuesta de los parámetros evaluados para los 12 tratamientos evaluados: a) viscosidad, b) %(v/v) de etanol, c) °Brix.

Utilizando la herramienta “numerical optimization” de Desing Expert, y teniendo en cuenta las regiones optimas del proceso previamente identificadas para la maximización del % de etanol y la minimización de la viscosidad se identificaron los valores óptimos de los factores para alcanzar este objetivo, para ello se introdujo el criterio “mínimo” con una importancia de 1 (escala de 5 puntos) para la viscosidad y el criterio “máximo” con una importancia de 5, para él % de etanol colocando las regiones óptimas para cada uno en los límites “mínimo”

y “máximo”. En la sección de soluciones el software arrojó 5 opciones de las cuales la seleccionada presentó los valores de 70.82 horas de fermentación y 82 g/L de concentración de miel, para obtener un 45% de etanol y una viscosidad de 4.1473 (cPs). Estas condiciones óptimas del proceso se probaron experimentalmente con el fin de comprobar la eficacia del modelo.

Concluimos que pueden desarrollarse productos alternativos a partir de las fermentaciones con ambas especies de *Lactobacillus* pues a pesar de su alta viscosidad presentan propiedades organolépticas agradables con consistencia cremosa. Además se logró obtener una bebida alcohólica fermentada con levadura a partir de la combinación de aguamiel de Agave y miel de abeja como una alternativa al pulque. Utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), se identificaron las condiciones óptimas del proceso para maximizar el contenido de etanol y minimizar el valor de la viscosidad de la bebida fermentada, siendo estas condiciones de 70 horas de fermentación y 80 g/L de miel de abeja.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el financiamiento proporcionado por el Instituto Politécnico Nacional a través del proyecto SIP 20161202.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Acosta-Romero C. 2012. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. UNC. Colombia. pp 72.

Chauhan B. & Gupta R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14, *Process Biochemistry*, 39(12): 2115-2122.

Dirección General de Normas. “Aguamiel, hidromiel”. NMX-V-022-1972. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>, México, (consultado diciembre 31, 2016)

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

García-Garibay M., Quintero-Ramírez R. y López-Munguía Canales, A. 2004. *Biotechnología alimentaria*. Editorial Limusa. pp. 301-306.

Gutiérrez H, De la Vara R. 2008. *Análisis y diseño de experimentos*. 2da edición. McGraw Hill. México. pp 394.

Muñiz-Marquez D.B., Rodríguez-Jasso R.M., Rodríguez-Herrera R., Contreras-Esquivel J.C. & Aguilar-González. 2013. Producción artesanal del aguamiel: una bebida tradicional mexicana. *A.Q.M. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(10): 12-19.

“Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo”. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. SEMARNAT. Diario Oficial de la Federación (Segunda Sección) Miércoles 06 de marzo de 2002.

Sanchez-Marroquin A. & Hope P.H. 1953. Agave juice, Fermentation and Chemical Composition of Some Species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1(3):246-249.

Sanchez-Marroquin A. 1970. Investigaciones realizadas en la Facultad de Química, UNAM, tendientes a la industrialización del agave. *Revista de la Sociedad Química de México*. 4:184-188.