

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“EMPLEO DEL SUBPRODUCTO  
RESULTANTE DEL FRACCIONAMIENTO DE  
LA YEMA DE HUEVO COMO BASE PARA LA  
ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA  
ALCOHÓLICA”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**Ainhoa Artime González**

**Julio, 2014**



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi tutora Adriana Laca quien con sus conocimientos y experiencias me ha guiado en el transcurso del proyecto. Y a Amanda laca por su paciencia y su ayuda en muchas horas de laboratorio.

A todos los profesores que en su momento me dieron clases, por dejar en mí parte de su conocimiento y contribuir en mi formación profesional y personal.

A los técnicos de los diferentes laboratorios, por cederme material para la realización del proyecto siempre que era necesario

A mis compañeros porque hemos compartido momentos felices y amargos, por el inmenso cariño y apoyo brindado durante este proyecto. Y sobre todo a Vanesa García Pintado por su amistad en incontables momentos de clase, estudio y laboratorio.

A mis padres y a Albano por estar a mi lado en los momentos de trabajo más pesado y porque sin su confianza no hubiese logrado concluir este proyecto.

# ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	6
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>2</b>
2.1 <u>El huevo</u>	2
2.1.1 Cascara	2
2.1.2 Clara o albumen	4
2.1.3 Yema o vitelo	5
2.1.4 Microbiología	9
2.1.5 Propiedades del huevo	11
2.1.6 Ovoproductos	13
2.2 <u>Melaza de caña de azúcar</u>	17
2.2.1 Obtención de la melaza	18
2.2.2 Composición	20
2.2.3 Propiedades físico-químicas	21
2.2.4 Microorganismos de la melaza	21
2.2.5 Aprovechamiento de la melaza	22
2.3 <u>Fermentación alcohólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	22
2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.3.2 Proceso de fermentación	24
2.4 <u>Bebidas fermentadas y licores</u>	26
2.4.1 Cerveza	26
2.4.2 Sidra natural	28
2.4.3 Vino	30

2.4.4 Sake	32
2.4.5 Fermentación alcohólica de leche	33
2.4.6 Hidromiel	33
2.4.7 Licor de huevo	35
2.4.8 Ponche de huevo	35
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1 <u>Obtención y caracterización del medio a fermentar</u>	36
3.1.1 Fraccionamiento de la yema de huevo	36
3.1.2 Caracterización del medio	37
3.2 <u>Proceso fermentativo</u>	41
3.2.1 Condiciones de cultivo	41
3.2.2 Toma de muestras y análisis	43
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
4.1 <u>Caracterización de la fracción residual</u>	50
4.1.1 Análisis físico-químicos	50
4.1.2 Microbiología y pasteurización	50
4.2 <u>Proceso fermentativo</u>	52
4.2.1 Evolución de parámetros físico-químicos	52
4.2.2 Microbiología	58
4.2.3 Características del producto fina	63
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>

## **RESUMEN**

El sector agroalimentario genera gran cantidad de subproductos que son gestionados como residuos o en aplicaciones de bajo valor. Muchos de estos, con la aplicación de nuevas tecnologías podrían revalorizarse además de disminuir su efecto contaminante.

El desarrollo de nuevas técnicas de fraccionamiento de la yema de huevo permite la obtención de productos de mayor valor añadido, pero también genera nuevas corrientes residuales. Tal es el caso de la corriente acuosa resultante de separar de la yema los gránulos y la fracción lipídica.

En este proyecto se realizó una caracterización físico-química de la fracción acuosa (contenido en azúcar, carbono, azufre, fósforo y nitrógeno) y microbiológica, con el fin de poseer una mayor información para su uso posterior como materia prima. A continuación se ensayó su empleo como base para la obtención de una bebida alcohólica de baja graduación. Para ello se realizaron fermentaciones, empleando esta fracción acuosa como sustrato por sí sola o con suplementación de azúcar o melaza, residuo de la industria azucarera. Con ello se obtuvieron datos cinéticos del proceso fermentativo, que permitieron obtener un mayor conocimiento del proceso, optimizar las condiciones operacionales y caracterizar el producto final obtenido.

## **ABSTRACT**

The agri-food sector generates lots of products that are managed as waste or low value applications. Many of these, with the application of new technologies may be revalued besides decreasing his polluting effect.

The development of new techniques for fractionation of egg yolk allows obtaining products with higher added value, but also creates new waste streams. Such is the case of the aqueous stream resulting from separation of yolk granules and the lipid fraction.

In this project, microbiological chemical and physical characterization of the aqueous fraction (sugar content, carbon, sulfur, phosphorus and nitrogen) and, in order to have greater information for later use as a raw material was made. Then use was tested as the basis for obtaining an alcoholic drink low alcohol. These fermentations were performed using this aqueous fraction as substrate alone or with sugar or molasses supplementation, residue of the sugar industry. This kinetic data of the fermentative process, which allowed us to obtain to greater understanding of the process, maximize operational conditions and characterize the final product was obtained.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales partes del huevo.	2
Figura 2. La cáscara y sus membranas.	3
Figura 3. Componentes de la yema.	6
Figura 4. Componentes de los gránulos.	9
Figura 5. Proporción de ácidos grasos de la yema.	12
Figura 6. Proceso de elaboración de los ovoproductos (líquidos y desecados).	15
Figura 7. Principales pasos para la obtención de la melaza.	19
Figura 8. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	23
Figura 9. El ácido pirúvico formado en la glucólisis se convierte anaeróbicamente en etanol.	25
Figura 10. Producción de la malta.	26
Figura 11. Producción de la cerveza.	27
Figura 12. Proceso de elaboración de la sidra natural.	29
Figura 13. Elaboración del vino.	31
Figura 14. Proceso de elaboración del sake.	33
Figura 15. Proceso de elaboración de la hidromiel.	34
Figura 16. Proceso de fraccionamiento de la yema de huevo.	36
Figura 17. Matraz kitasato y bomba de vacío.	37
Figura 18. Muestra más solución cúprica.	39
Figura 19. Adición de solución alcalina.	39
Figura 20. Adición de yoduro de potasio.	39
Figura 21. Adición de almidón.	40
Figura 22. Valoración con tiosulfato de sodio.	40
Figura 23. Observación en placa de colonias de levaduras.	41
Figura 24. Botes de vidrio donde se realizó la fermentación.	42
Figura 25. Incubador Excella E24.	43

Figura 26. Cromatógrafo de gases CLARUS 400.	44
Figura 27. Recta de calibrado.	45
Figura 28. Equipo de cromatografía de Alta Eficacia.	46
Figura 29. Espectrofotómetro UltraScan VIS.	47
Figura 30. Extractor DET-GRAS.	47
Figura 31. A. Medio fresco B. Medio congelado C. Medio pasteurizado 1 minuto D. Medio pasteurizado 4 minutos.	51
Figura 32. Evolución del pH durante las fermentaciones con: A. Medio sin suplementar B. Medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. Medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. Medio suplementado con melaza (equivalente a 50 g/L de azúcar).	53
Figura 33. Evolución de la concentración de azúcar durante las fermentaciones con: A. Medio sin suplementar B. Medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. Medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. Medio suplementado con melaza (equivalente a 50 g/L de azúcar).	54
Figura 34. Evolución de la concentración de etanol durante las fermentaciones con: A. Medio sin suplementar B. Medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. Medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. Medio suplementado con melaza (equivalente a 50 g/L de azúcar).	56
Figura 35. Evolución del recuento de levaduras: línea naranja medio sin suplementar y línea azul medio suplementado con glucosa.	59
Figura 36. Evolución del recuento de las colonias blancas pequeñas. A. Línea naranja medio sin suplementar, línea azul medio suplementado con glucosa B. Medio suplementado con melaza (duplicados).	60
Figura 37. Recuento de colonias mucosas: línea naranja medio sin suplementar y línea azul medio suplementado con glucosa.	60
Figura 38. Observación en fresco del medio suplementado con glucosa. A. Flóculos y cadenas de levaduras B. Levaduras del género <i>Torula</i> .	61
Figura 39. Observación en fresco del medio suplementado con melaza. A. Flóculos y cadenas de levaduras B. Levaduras del género <i>Torula</i> .	61
Figura 40. Observación en placa de colonias blancas pequeñas (Izquierda) y su vista al microscopio con tinción Gram (Derecha).	62
Figura 41. Observación en placa de colonias blancas más grandes (Izquierda) y su vista al microscopio con tinción Gram (Derecha).	62
Figura 42. Observación en placa de colonias mucosas y masa de levaduras (Izquierda) y su vista al microscopio, arriba a la derecha las colonias mucosas y abajo a la derecha las levaduras.	63
Figura 43. Botes con el medio durante las fermentaciones.	64

Figura 44. Representación comparativa de los parámetros de color para: producto fermentado suplementado con 50g/L (filtrada) (en azul oscuro), producto fermentado suplementado con 100g/L (filtrada) (en rojo), producto fermentado suplementado con melaza (filtrada)(en morado), zumo de fruta con leche (azul claro), bebida de café (verde). 66

Figura. 45 Productos de la fermentación después de filtrar. 67

Figura 46. Presencia/ausencia de ácidos orgánicos. A. Fracción sin suplementar antes de fermentar B. Producto fermentado sin suplementar C. Producto fermentado suplementado con 50 g/L de glucosa D. Producto fermentado suplementado con 100 g/L de glucosa. E. fracción suplementada con melaza antes de fermentar F. Producto fermentado suplementado con melaza. 68

Figura 47. Presencia/ausencia de ácidos orgánicos. E. fracción suplementada con melaza antes de fermentar. F. Producto fermentado suplementado con melaza. 69

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Carotenoides de la yema de huevo.	8
Tabla 2. Proteínas de la yema de huevo y su distribución.	8
Tabla 3. Diferentes usos del huevo y sus partes en la industria alimentaria.	14
Tabla 4. Composición de la melaza de caña de azúcar.	18
Tabla 5. Microorganismos en la melaza.	21
Tabla 6. Usos de la melaza.	22
Tabla 7. Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	23
Tabla 8. Características generales de las levaduras.	23
Tabla 9. Valores de la caracterización de la fracción acuosa.	50
Tabla 10. Valores de la ufc/mL en la fracción acuosa.	52
Tabla 11. Rendimientos del consumo de azúcares.	55
Tabla 12. Rendimientos del etanol para los diferentes medios.	58
Tabla 13. Concentraciones de grasa en las diferentes capas del sustrato en las fermentaciones.	65
Tabla 14. Medidas de color en los distintos medios antes y después de la fermentación y filtrados.	65
Tabla 15. Presencia o ausencia de los diferentes ácidos orgánicos medidos.	69

## INTRODUCCIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas del siglo XXI es la contaminación ambiental, derivado de la actividad industrial, que aunque aporte bienes, servicios y empleos a la economía es también una fuente importante de contaminación y residuos. Generalmente el sector agroalimentario considera residuos a todo aquello que no tiene fines alimenticios y en realidad muchos de estos residuos deberían considerarse como subproductos pues, en numerosas ocasiones, son valorizables mediante la aplicación de diversas tecnologías o cambios de manejo y por tanto son susceptibles de ser aprovechados para otra actividad, pasando a tener un valor económico, además de añadirle un valor ambiental. Todo esto hace que la rentabilidad futura de la industria pase no solo porque la gestión de los residuos generados no suponga una carga económica para el productor, sino además se consigan crear mercados alternativos para el aprovechamiento de estos subproductos.

El huevo es uno de los alimentos indispensables en la dieta de los consumidores, produciéndose en el mercado español unos 1.040 millones de docenas de huevos al año. Este aumento de la demanda ha producido incremento en la ganadería avícola, lo que ha originado la aparición de nuevas formas de subproductos asociados a esta actividad y una creciente problemática medioambiental debido a una gestión desordenada de los residuos generados. Entre los residuos generados en las explotaciones avícolas destacan, la gallinaza y los cadáveres no destinados para el consumo humano. Si bien son productos que inicialmente no contienen compuestos de alto riesgo medioambiental, la producción y acumulación de los mismos en grandes volúmenes pueden plantear problemas de gestión. Otra serie de residuos producidos, cuya gestión implica costes adicionales para los productores son: huevos rotos, plumas, envases vacíos de medicamentos, plásticos o residuos asimilables a urbanos, etc. (Fernández, et al, 2014).

Por otra parte los avances en la tecnología de ovoproductos han desarrollado procesos que permiten la obtención de fracciones con mayor valor añadido que el producto de base, generándose con ello nuevos efluentes residuales que requieren gestión. Así resulta patente el interés en el desarrollo de alternativas para los distintos residuos generados

En el grupo TBR del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Oviedo se ha desarrollado un procedimiento que permite separar distintas fracciones de la yema del huevo, empleando técnicas simples y no agresivas, que permiten mantener su valor nutritivo y tecnológico. Se pueden obtener así los gránulos y la fracción lipídica, de interés en industria alimentaria y cosmética (Laca, et al, 2010), resultante una fracción acuosa residual que todavía contiene compuestos de interés alimentario.

El objetivo de este proyecto es analizar la posibilidad de emplear esta fracción como base para la elaboración de una bebida alcohólica de baja graduación. Para ello en primer lugar se realiza una caracterización del producto, tanto a nivel físico-química como microbiológico, para a continuación proceder a la realización de fermentaciones con distintos contenidos en azúcar, utilizando tanto glucosa como melaza, evaluando el proceso productivo y el producto final.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 2.1 El huevo

El huevo es un alimento con gran valor nutritivo. Constituido por tres partes principales cascara, clara y yema. La complejidad de la composición del huevo y las muy diferentes características de las partes que lo componen ofrecen múltiples posibilidades de utilización en la industria en función de las cualidades fisicoquímicas u organolépticas que se requieran. Así, el huevo tiene capacidad adhesiva, espumante, aglutinante, clarificante, coagulante y gelificante, colorante, emulsionante, aromatizante y espesante, entre otras. Por eso, el huevo se hace imprescindible en multitud de productos para aportar sus propiedades funcionales características.

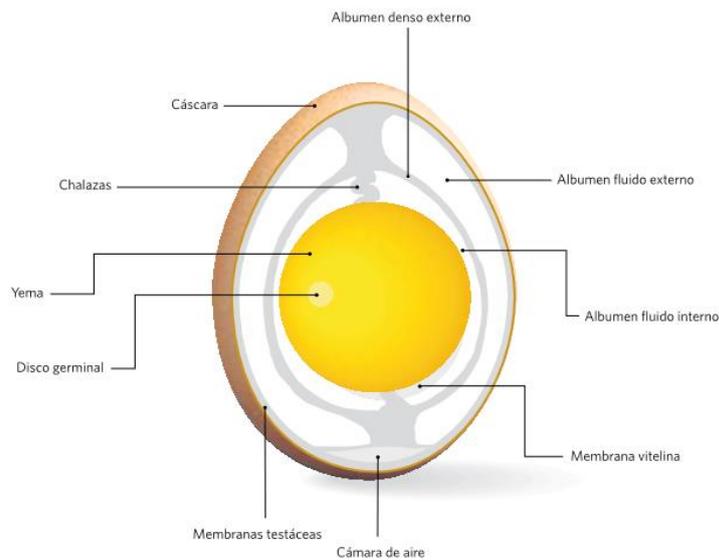


Figura 1. Principales partes del huevo (Instituto de estudios del huevo, 2009)

##### 2.1.1 Cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia, ya que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida por una matriz cálcica formada por una matriz de fibras y esferas proteicas y de mucopolisacáridos, con cristales de calcita en los intersticios. La matriz tiene dos zonas: la inferior, en contacto con las membranas y la superior, cuyas fibras corren paralelas a la superficie de la cáscara. Esta estructura da una gran resistencia a la cáscara.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Entre sus componentes minerales el calcio es el más importante, encontrándose proporciones mucho menores de sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. Está compuesta principalmente por carbonato cálcico (94%) y proteínas duras (4%).

La cáscara está atravesada por numerosos poros que forman túneles entre los cristales minerales y permiten el intercambio gaseoso (tanto vapor de agua como CO<sub>2</sub>) entre el interior y el exterior. Su número varía entre 7 000 y 15 000 y son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo. Está recubierta por la cutícula, que tiene un grosor de 20 micras, y cubre casi todos los poros. Esta cutícula posee un aspecto similar al de una esponja lo que facilita el paso de aire pero impide la entrada de microorganismos.

El color de la cáscara, que puede ser blanco o marrón según la raza de la gallina, depende de la concentración de pigmentos, denominados porfirinas, depositados en la matriz cálcica y no afecta a la calidad, ni a las propiedades nutritivas del huevo. Los diferentes niveles de coloración dependen del estado individual de la gallina. La alimentación o el sistema de cría no influyen en el color de la cáscara y tampoco en su intensidad.

La calidad o resistencia de la cáscara depende principalmente del metabolismo mineral de la gallina y, a su vez, de una adecuada alimentación. Otros factores que influyen sobre la calidad de la cáscara son la genética, el estado sanitario y la temperatura ambiente. El grosor es otro aspecto a destacar, 1/3 de mm es un estándar que garantiza menos del 50% de las roturas en la manipulación.

La cáscara está recubierta externamente por una membrana, llamada cutícula, que está formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. La principal función de esta película de mucina consiste en cerrar los poros, formando una barrera física contra la penetración de microorganismos. También evita la pérdida de agua y da un aspecto brillante al huevo. Tras la puesta se presenta en forma húmeda, luego se seca y se va deteriorando y, entre los dos y cuatro días desde la puesta, desaparece. Si el huevo se lava o se frota, puede desaparecer antes.

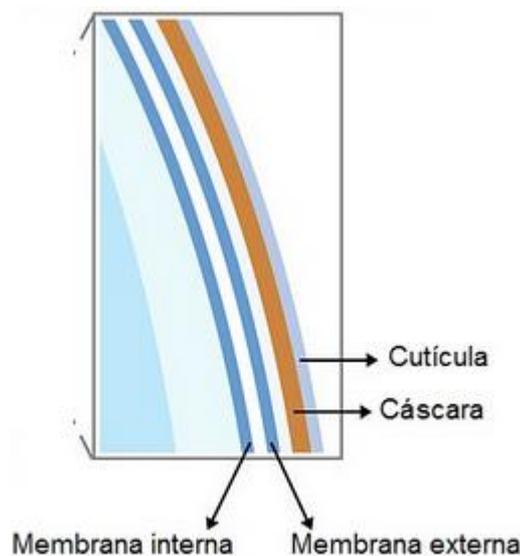


Figura 2. La cáscara y sus membranas (www.gallosedragliofarm.com).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Las membranas que recubren el interior de la cáscara son dos: membrana testácea interna y externa. Ambas rodean el albúmen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana. Las membranas testáceas se encuentran fuertemente pegadas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Poco tiempo después de la puesta, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse (la temperatura corporal de la gallina es de 39°C, la misma del huevo recién puesto) penetra aire en el polo grueso, por su mayor concentración de poros, y se separan en esta zona las membranas para constituir la cámara de aire. La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas y la presencia de lisozima en la matriz albuminosa impide la entrada de algunos microorganismos y retarda la entrada de otros. La membrana externa es mucho más porosa y sirve como asentamiento para la formación de la cáscara. A medida que el huevo pierde frescura, pierde también agua en forma de vapor a través de los poros de la cáscara y la cámara de aire se expande. Un huevo sometido a altas temperaturas «envejece» antes. La altura de la cámara de aire es una de las medidas de la frescura de un huevo en términos de calidad, independientemente de los días transcurridos tras la puesta.

La integridad y limpieza de la cáscara son factores que determinan si un huevo es apto o no para su consumo como huevo fresco. Cuando la cáscara está sucia o deteriorada es posible que los microorganismos adheridos a la superficie penetren al interior del huevo. Por esta razón, no pueden comercializarse para consumo humano directo los huevos cuyas cáscaras presenten suciedad, fisuras o roturas (Instituto de estudios del huevo, 2009, Rendueles, 2014)

### 2.1.2 Clara o albúmen

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albúmen denso y el fluido. El albúmen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo. El albúmen fluido es el más próximo a la cáscara. A medida que el huevo pierde frescura, el albúmen denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido, quedando finalmente la clara muy líquida y sin apenas consistencia a la vista.

La clara o albúmen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 12%). La proteína más importante (54% del total proteico) es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario ya que por acción del calor adquiere una estructura gelatinosa, importante sobre todo para repostería.

En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y está exenta de lípidos. Las vitaminas B2 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema. La clara es transparente, aunque en ocasiones pueda presentar alguna «nube» blanquecina que no supone ningún problema para su consumo y suele estar relacionada con la frescura del huevo.

Las principales proteínas del albúmen son:

*Ovoalbúmina*: es una fosfoglicoproteína. Y es la proteína más predominante. Durante el almacenamiento se transforma en la sovoalbúmina, una forma más compacta y estable al calor. *Conalbúmina u ovotransferrina*: glicoproteína que destaca por su facilidad para unirse a cationes  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ .

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

*Ovomucoide*: glucoproteína muy resistente al calor. Inhibe la tripsina.

*Lisozima*: enzima proteico de acción lítica sobre la pared bacteriana. Hidrolizando las uniones beta (1,4), entre los residuos de ácido N-acetil-D-glucosamina que constituyen el esqueleto del peptidoglicano. La lisozima además tiene un alto carácter electropositivo y por ello puede igualmente aglutinar a las bacterias, que presentan sin excepciones carga electronegativa. (Caso, 2014)

*Ovomucina*: glicoproteína cuyas fibras dan la consistencia de gel a la clara.

*Ovoglobulinas*: agente espumante.

*Flavoproteínas*: glicoproteína asociada a la riboflavina del complejo vitamínico B en la clara.

*Avidina*: glicoproteína asociada a la biotina del complejo vitamínico B, forma un complejo estable no absorbible por el intestino (Instituto de estudios del huevo, 2009, Rendueles, 2014).

### 2.1.3 Yema o vitelo

La yema es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina, que da la forma a la yema y permite que esta se mantenga separada de la clara o albumen. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%. Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina. Tiene otras propiedades como capacidad emulsionante, gelificante, colorante, aromatizante y antioxidante, que pueden variar según sus tratamientos de conservación (calor, congelación, secado, etc) y las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, etc). Por estas características, la yema de huevo es ampliamente usada la industria alimentaria, como base de preparación de muchos productos (mayonesa, aderezos de ensaladas, tortas, pasta, cremas, etc), así como en la farmacéutica, cosmética, biotecnológica y médica, entre otras.

La yema aporta el 75% de las calorías, la mayoría del hierro, vitamina A, tiamina, vitaminas liposolubles y la mitad de las proteínas, del contenido total del huevo. Así mismo posee la mayoría de los ácidos grasos que el organismo humano no puede sintetizar, conocidos como esenciales. Sin embargo, presenta un alto contenido en colesterol, el cual ha sido asociado a problemas cardiovasculares cuando hay altas ingestas en la dieta diaria, haciendo del huevo un alimento de consumo moderado, a pesar de sus demás bondades.

La membrana vitelina que envuelve la yema posee dos capas separadas para dar la resistencia deseada. En los huevos frescos las fibras de esta membrana se entrelazan con las chalazas las cuales impiden la movilidad de la yema dentro del albumen. El valor económico de la yema depende de factores como su esfericidad, resistencia de la membrana o color. El tiempo y la humedad van dañando la calidad general del huevo, incluida la de la yema, que se diluye y pierde resistencia en la membrana. Su pH oscila entre 6 (fresco) y 6,4 (al cabo de unas semanas) (Anton M., et al, 2007).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En la figura se muestran los principales componentes presentes en la yema de huevo de gallina:

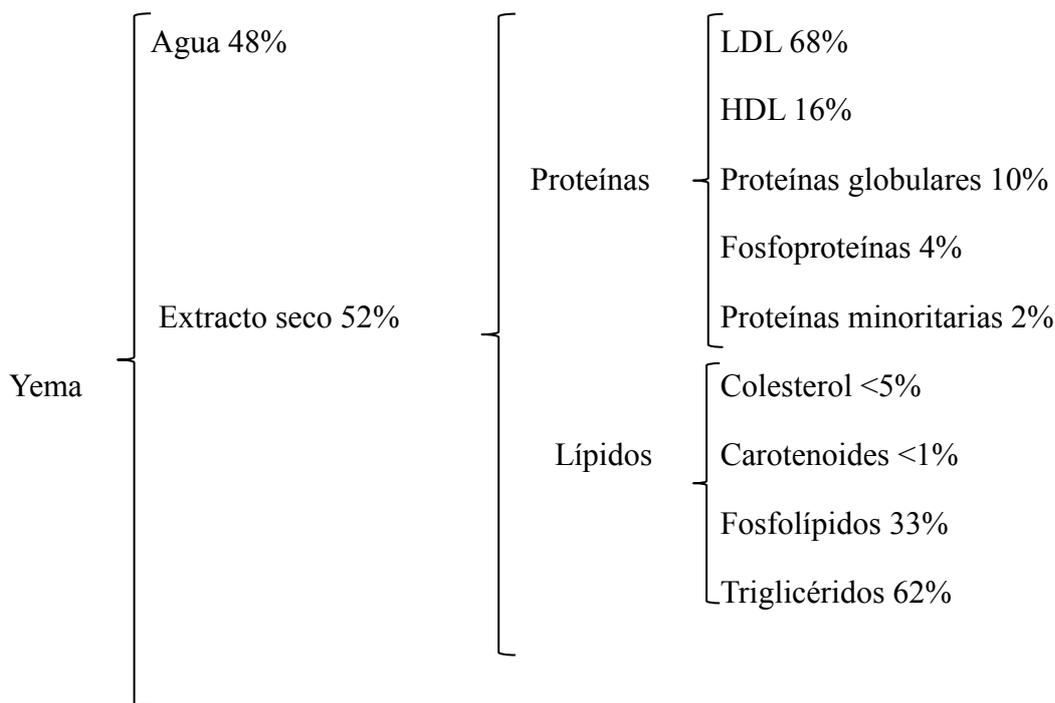


Figura 3. Componentes de la yema.

### a) *Composición de la yema*

#### - Proteínas de la yema

Dentro de la clasificación de proteínas se tienen en cuenta tanto las libres como las asociadas a lípidos, conocidas como lipoproteínas. Las lipoproteínas LDL están presentes en mayor porcentaje (68% del contenido proteico) y se caracterizan por su propiedad emulsionante, que se deteriora por congelación. Están constituidas por un 80 - 89% de lípidos y son partículas esféricas con un núcleo de lípidos no polar, rodeado por una capa de apoproteínas y fosfolípidos.

Las lipoproteínas HDL más importantes son las  $\alpha$  y  $\beta$  lipovitelinas (21% de los lípidos de la yema), los cuales forman complejos con fosfoproteínas, principalmente fosvitinas. Las fosvitinas están formadas en un 10% por fósforo (80% del presente en la yema) y poseen un 54% de contenido de serina, en forma de ésteres de ácido fosfórico. Las condiciones de acidez o baja fuerza iónica permiten su solubilización en agua, formando complejos con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ; confiriéndole un efecto bactericida indirecto, al privar a los microorganismos de los nutrientes minoritarios. Las livetinas, presentes mayoritariamente en el plasma de la yema (30% de las proteínas de esta fracción), contienen gran cantidad de las enzimas del huevo, principalmente aquellas con baja actividad ( $\alpha$ -amilasa, colinesterasa, fosfatasa, etc.); así mismo, forman parte de este grupo las inmunoglobulinas, y su comportamiento es similar al de las proteínas de la sangre. (Sugino, et al, 1997).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### - Lípidos de la yema

Los lípidos son el principal componente de la yema de huevo (60% del extracto seco) e incluyen triglicéridos, fosfolípidos, colesterol, cerebrósidos y otros lípidos menores. Su composición depende de la alimentación de las gallinas, sin embargo una aproximación a estos valores es: 30 - 35% de ácidos grasos saturados, 40 - 45% de ácidos grasos monoinsaturados, 20-25% de ácidos grasos poliinsaturados (Anton, et al, 2007).

Los principales ácidos grasos son oleico, palmítico y linoléico, de los cuales, oleico y palmítico, están presentes en mayor proporción en los triglicéridos.

Los fosfolípidos, son importantes componentes de las lipoproteínas de la yema de huevo; poseen extremos lipo e hidrofílicos y se caracterizan por sus propiedades emulsionantes. Se encuentran divididos en clases  $\alpha$  y  $\beta$ , en los cuales los ácidos grasos unidos en posición  $\alpha$  son principalmente saturados, mientras que los unidos en la posición  $\beta$  son insaturados. De igual forma, en esta fracción están concentrados los ácidos grasos poliinsaturados; tales como el ácido araquidónico y el docosahexanoico (DHA), que son beneficiosos para el hombre, en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Dentro de los fosfolípidos, la lecitina es la más importante, por es indispensable en todas las células vivas, ofreciendo protección frente a la oxidación; es una fuente de vitamina B, y gracias a su poder emulgente de grasas ha sido empleada para la fabricación de comidas, cosméticos, farmacéuticos, y la industria médica. El colesterol también depende de la alimentación de la gallina, aunque gran parte es sintetizada en el hígado del animal, en la elaboración de las lipoproteínas. El 84% está presente en forma libre (participa en la estructura de la LDL), mientras que el 16% restante es éster (presente en el núcleo de la LDL) (Sugino, et al, 1997).

Los cerebrósidos son glicolípidos, compuestos por azúcares (galactosa y sucrosa), esfingosina y una base nitrogenada. La yema de huevo contiene la ovofrenosina y la ovokerasian.

### - Componentes minoritarios de la yema

Dentro de los componentes minoritarios de la yema, los minerales constituyen el 1% de la yema, siendo el fósforo el mineral más abundante. Los hidratos de carbono son oligosacáridos, compuestos de manosa y glucosamina, unidos a proteínas (0,7% de la yema) y glucosa libre (0,3% de la yema).

El color característico de la yema está dado por la presencia de carotenoides, cuya concentración tiene relevancia económica, ya que el color es tomado como criterio de calidad (Anton, et al, 2007). Adicionalmente Los carotenoides, en la actualidad, gozan de especial reconocimiento como coadyuvantes en la prevención de determinados tipos de cáncer. El contenido de pigmentos en la yema es de 0,02% del extracto seco y están constituidos por carotenoides (carotenos y xantófilas) y riboflavinas (vitamina B2). Los carotenoides son los responsables del color propio de la yema, pero no pueden ser sintetizados por el metabolismo de las gallinas, por tanto, la alimentación es su principal fuente, y aunque una buena dieta de alfalfa o de algas desecadas puede ser suficiente, a veces se aditiva el pienso con beta apo 8 carotenal y/o cantaxantina que refuerzan los colores. Su clasificación se muestra en la tabla 1 (Sugino, et al, 1997).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 1. Carotenoides de la yema de huevo

<b>Pigmentos</b>		<b>Contenido %</b>
Carotenos	$\alpha$ -Caroteno	Trazas
	$\beta$ -Caroteno	0.03
Xantófilas	Criptoxantina	0.03
	Luteína	0.1
	Zeaxantina	0.2

### a) Fracciones de la yema

La yema de huevo es un sistema de suspensión de partículas en un fluido amarillo, con un alto contenido proteico; con una estructura compleja que hacen posible fraccionarla, con una previa dilución que disminuye la viscosidad, permite la movilidad de las partículas. El resultado es un sobrenadante de coloración naranja fuerte, denominado plasma, y un precipitado de baja coloración, denominado gránulos (Anton, et al, 2007). La distribución proteica se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Proteínas de la yema de huevo y su distribución

<b>Fraccion</b>	<b>Plasma (%)</b>	<b>Granulos (%)</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>
% Proteínas de la yema	72	22	
HDL:			
$\alpha$ -Lipovitelina	-	41	400
$\beta$ -Lipovitelina	-	29	400
LDL	87	12	4800
Fosvitinas	-	17	36
Livetinas	13	-	$\alpha$ : 80 $\beta$ : 42 $\gamma$ : 180

Las dos fracciones que se obtienen a partir de la yema se describen a continuación con mayor detalle:

#### - Gránulos

Los gránulos constituyen aproximadamente el 21% de la materia seca de la yema; con un contenido del 50% de las proteínas de la yema y 7% de sus lípidos; su composición se muestra en la figura 4. Los lípidos de los gránulos están constituidos por triglicéridos (60%), fosfolípidos (35%) y colesterol (5%). Los principales componentes proteicos y lipo-proteicos

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

son la fosvitina (16%), HDL (70%) y LDL (12%). Las HDL y fosvitinas permanecen unidas por numerosos puentes de fosfo-calcio formados entre sus residuos fosforilados; lo que confiere a los gránulos una estructura compacta, poco hidratada, débilmente accesible a enzimas, resistente a la desnaturalización térmica y la gelación (Anton, et al, 2007).

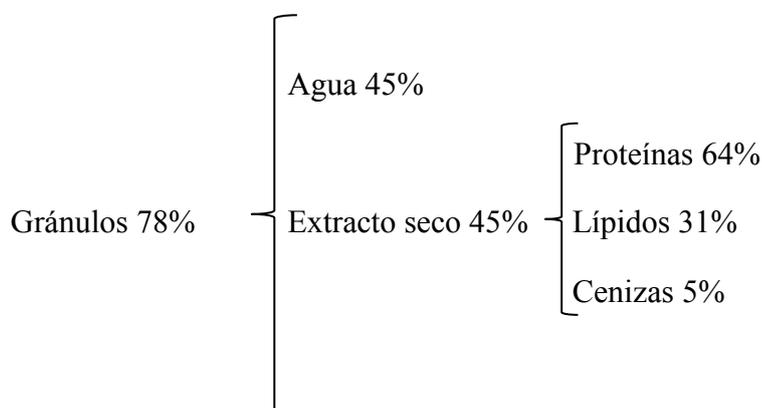


Figura 4. Componentes de los gránulos.

### - Plasma

El plasma es aproximadamente el 79% de la materia seca de la yema, compuesta en un 85% de LDL y 15% de livetinas (o proteínas globulares desprovistas de lípidos). Posee el 90% de los lípidos de la yema, constituidos por triglicéridos (67%), fosfolípidos (25%) y colesterol (5%) (Anton M., et al, 2007).

### 2.1.4 Microbiología

Existe una contaminación de los huevos antes de la puesta, se trata de una contaminación ligada a la presencia de microorganismos, patógenos o no, en el aparato genital de la ponedora. Por ejemplo, una de cada dos ponedoras tiene bacterias no patógenas, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Micrococcus*, en el oviducto y en el ovario. Estas bacterias, se encuentran raramente en el interior de los huevos y juegan un papel muy poco importante en la alteración de los mismos. De hecho, la mayor parte de los huevos recién puestos son estériles.

Por otro lado, los huevos pueden contaminarse por bacterias existentes en la alimentación de la gallina, que se transmiten desde la vía digestiva hasta el ovario. Un caso muy común es el de la *Salmonella*, patógena para el ser humano, aunque la transmisión transovárica de estas bacterias al huevo precisa de un nivel muy alto de contaminación de los alimentos. Gracias a los progresos en las condiciones de cría, alimentación animal y veterinaria, el nivel de infección por *Salmonella* a disminuido mucho.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Otras bacterias que pueden contaminar los huevos antes de la puesta son *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Listeria* y *Pseudomonas*. Sin embargo dicha contaminación es difícil de determinar ya que las técnicas de esterilización de la cáscara no son eficaces y existe riesgo de contaminación ambiental.

Otro tipo de contaminación del huevo es durante o después de la puesta, se puede decir que el 90% de los huevos se contaminan de esta forma. El número de microorganismos presentes en la cáscara estará entre los  $10^5$ . Esta contaminación externa depende muy estrechamente de las condiciones de higiene durante la producción. Una parte importante procede de las heces del animal, del lugar de la puesta y del polvo del aire. La contaminación durante la puesta se debe a que las aves, el oviducto y el intestino desembocan en un conducto denominado cloaca, por lo que los huevos pueden contaminarse externamente con materia fecal de la propia gallina.

En los huevos aparece principalmente *Micrococcus*, que resiste a las condiciones de sequedad que representa la superficie de la cáscara. Otras bacterias encontradas son: *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Flavobacterium*. En los huevos pasteurizados y desecados por atomización pueden sobrevivir microorganismos termófilos del género *Bacillus*. Entre los mohos pueden aparecer representantes del género *Mucor*, *Penicillium*... mientras que de levaduras solo aparece *Torula*.

La contaminación microbiana de los huevos depende del estado de limpieza de los lugares de puesta y de la manera que son manipulados después de ser obtenidos. Si la cáscara permanece intacta, la única vía de penetración de los microorganismos al interior del huevo son los poros. Y aunque la clara contiene lisozima (de acción lítica sobre la pared bacteriana) si los microorganismos atraviesan los poros las consecuencias pueden ser graves.

En ambientes húmedos pueden desarrollarse mohos en la superficie, cuyo micelio puede hidrolizar la cutícula, destaponando los poros y facilitando la penetración de los microorganismos al interior. Es muy importante que el embalaje de los huevos ya que contribuye a eliminar el nivel de humedad, por eso son preferibles los envases de cartón a los de plástico.

La clara del huevo es una buena protección contra los microorganismos por su alto coeficiente de viscosidad, y su contenido en lisozima, alto pH de hasta un 9,5 y su contenido en ovotransferrina (Rendueles, 2014, Caso, 2014).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1.5 Propiedades del huevo

La elevada calidad y biodisponibilidad de la proteína del huevo la convierte en una gran fuente de nutrientes en las primeras etapas de la vida. También es esencial para los deportistas que tratan de ganar músculo y en personas mayores, ya que les ayuda a contrarrestar la pérdida de masa muscular asociada a la edad. Estudios recientes demuestran que, cuando las mujeres mayores incrementan su consumo proteico, también incrementan la densidad mineral del hueso y desciende el riesgo de rotura ósea, especialmente de la cadera.

Por su composición nutricional el huevo es un alimento con una gran capacidad saciante, lo que hace que tenga un interés especial en las dietas de adelgazamiento. Por ello, puede ser de interés incorporar huevos de la forma más natural y con menos grasa añadida (pasados por agua, cocidos) al desayuno o tomarlos a media mañana, por ejemplo en una dieta de adelgazamiento como un «método» para llegar a la hora de la comida sin sentir sensación de hambre.

El huevo es uno de los alimentos de origen animal con menos grasas saturadas y en el que la relación entre los ácidos grasos insaturados y los saturados (índice AgI/Ags) es considerada más que aceptable y, por tanto, recomendable en términos de nutrición. En el huevo no hay grasas denominadas trans. La grasa de los huevos se encuentra únicamente en la yema.

Los huevos forman parte de una dieta saludable. Un huevo de aproximadamente 60 gramos de porción comestible (correspondiente al huevo de clase L) aporta 85 calorías, lo que supone un 4% de la Cantidad Diaria Recomendada para un adulto, que necesita 2.000 calorías al día. Con este pequeño aporte energético, contiene el 7% de la cantidad diaria de proteína recomendada y una amplia variedad de nutrientes como las vitas-minas A, B8, B12, D, folatos, hierro, fósforo, selenio, yodo y zinc en varias cantidades. Ello hace el huevo un alimento nutricionalmente denso: rico en componentes nutritivos y con muy pocas calorías. La acción antioxidante de algunas vitaminas y oligoelementos del huevo ayuda a proteger a nuestro organismo de procesos degenerativos como el cáncer o la diabetes, así como de las enfermedades cardiovasculares. Muchos de los nutrientes del huevo están en una forma que los hace fácilmente asimilables. El calentamiento hasta la coagulación de la clara, facilita la digestión completa de las proteínas del albumen, la liberación de algunas vitaminas y minerales y la destrucción de posibles microorganismos contaminantes. La proteína del huevo es una gran fuente de nutrientes importante para el crecimiento de niños, para los deportistas que tratan de ganar músculo y en personas mayores, ya que les ayuda contrarrestar la pérdida de masa muscular asociada a la edad.



Figura 5. Proporción de ácidos grasos de la yema (Instituto de estudios del huevo, 2009)

Es destacable la riqueza del huevo en ácido oleico (monoinsaturado) presente también en el aceite de oliva y valorado porque ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y hepáticas. El huevo es la principal fuente de fosfolípidos de la dieta y contribuye a satisfacer de forma significativa las necesidades en ácido linoleico, ácido esencial que el organismo no puede sintetizar.

El huevo es la mejor fuente dietética de colina, que es un nutriente esencial dado que su carencia provoca problemas en el desarrollo y el normal funcionamiento de nuestro organismo. La colina y sus diferentes metabolitos son necesarios en diversos procesos metabólicos, en la construcción de membranas y del neurotransmisor acetilcolina. En las primeras etapas de la vida es esencial para el desarrollo del sistema nervioso y del cerebro, ayuda a prevenir las enfermedades cardiovasculares y mejora la actividad cerebral en la edad adulta. Contribuye a mantener la función de la memoria.

La yema de huevo es uno de los alimentos más ricos en lecitina (fosfatidilcolina), compuesto que participa en la formación de las sales biliares y que es un emulsionante muy efectivo de las grasas. Aunque la colina puede encontrarse en alimentos de origen vegetal, la lecitina de la yema de huevo es más aprovechable por el organismo.

La biotina es otro nutriente esencial que se encuentra en el huevo, vinculado a la protección de la piel y al mantenimiento de las funciones corporales. La ingesta diaria recomendada de biotina es de 30 mcg por día, que un huevo cubre aproximadamente en un 40%. Pero no es asimilada si se consume el huevo crudo; por ello es siempre recomendable calentar las claras hasta su coagulación. Los huevos contienen además riboflavina (20% de la cantidad diaria recomendada), importante para el crecimiento corporal y la producción de glóbulos rojos, selenio (12%), potente antioxidante, y vitamina K (31%), que interviene en la coagulación sanguínea.

La luteína y la zeaxantina son unos pigmentos de la familia de los carotenoides y se encuentran en los vegetales verdes y en la yema de huevo. Actúan como antioxidantes que se depositan en el ojo y se ha demostrado que lo protegen y previenen de las cataratas y la degeneración macular. Y son

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

beneficiosas para los enfermos de arterioesclerosis. Ambos compuestos convierten al huevo en alimento funcional.

Los principales responsables dietéticos del aumento de los niveles de colesterol en sangre son las grasas saturadas y las parcialmente hidrogenadas. Por ello, restringir el consumo de este tipo de grasas es más beneficioso para el perfil lipídico del plasma sanguíneo que reducir el colesterol de la dieta. Aunque la mayor parte de los alimentos ricos en colesterol suelen ser también ricos en grasas saturadas, el huevo no lo es. Un huevo de tamaño medio contiene unos 200 mg de colesterol, pero tiene más grasas insaturadas que saturadas y solo 70 calorías. Debido a su contenido en fosfolípidos, que interfieren en su absorción, este colesterol tiene muy poco efecto sobre el colesterol en sangre.

El huevo en la prevención cardiovascular: desechando el mito del colesterol procedente de los huevos no supone un riesgo añadido para padecer enfermedades cardiovasculares, permitiendo recomendar la toma de un huevo al día, en lugar de la recomendación previa, de hasta tres huevos a la semana (Instituto de estudios del huevo, 2009).

### 2.1.6 Ovoproductos

Un gran número de industrias utilizan el huevo como ingrediente de otros alimentos. La producción y comercialización de productos derivados del huevo ha progresado rápidamente en los últimos años. Esto se debe, por una parte, a la evolución de la industria alimentaria, que cada vez demanda materias primas y presentaciones comerciales más adecuadas a su proceso productivo evitando las complicaciones de manipular grandes cantidades de huevos frescos y sus residuos.

Los ovoproductos, según la legislación comunitaria, son "los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados." Todos llevan un control de calidad, el más frecuente es el control en las propiedades funcionales (poder espumante en las claras, poder emulsionante en las yemas, capacidad de coagulación, comportamiento en repostería, solubilidad de productos desecados, etc). En cualquier caso, en el control de calidad debe aparecer la inspección de materias primas, ingredientes y embalajes, la inspección de los procesos tecnológicos, el control de las condiciones sanitarias de producción, el examen químico, físico y microbiológico de los productos acabados, el control de los vertidos y la asistencia a los consumidores en materia de uso y manejo de los elaborados. (Rendueles, 2014).

#### a) *Elaboración de ovoproductos*

La fábrica de ovoproductos es la industria alimentaria que recibe huevos para su transformación y produce los derivados industriales del huevo. Estos pueden ser huevo líquido pasteurizado (entero, clara o yema), huevo cocido, tortillas, huevo en polvo y muchos otros. Los ovoproductos pueden destinarse al consumo humano directo o a industrias alimentarias y no alimentarias para otros procesados. Las industrias de elaboración de ovoproductos están registradas, autorizadas y controladas por las autoridades de Sanidad y Consumo y se identifican mediante un número de registro como industria alimentaria.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La gama de ovoproductos disponibles en el mercado es muy amplia, aunque los más comunes son: (Rendueles, 2014, Instituto de estudios del huevo, 2009).

- Huevo entero pasteurizado: Producto obtenido del huevo sin cáscara y sometido a pasteurización.
- Clara líquida pasteurizada: Producto obtenido del huevo fresco sin cáscara al que se le ha eliminado la yema y sometido a pasteurización.
- Yema líquida pasteurizada: Producto obtenido del huevo fresco sin cáscara, al que se le ha eliminado la clara y sometido al proceso de pasteurización.
- Huevo entero cocido (con o sin cáscara): Es el huevo que se ha cocido en agua con su cáscara y se vende pelado o sin pelar.
- Huevo deshidratado. Producto obtenido del huevo sin cáscara, pasteurizado y al que se le ha eliminado el agua de su composición.
- Clara deshidratada. Producto obtenido de la clara de huevo pasteurizada una vez eliminada el agua de su composición.
- Yema deshidratada. Producto obtenido de la yema de huevo pasteurizada y a la que se le ha eliminado parcial o totalmente el agua.
- Platos preparados cuyo ingrediente principal es el huevo. Tortillas y revueltos, por ejemplo, que pueden tener composición variable.

Tabla 3. Diferentes usos del huevo y sus partes en la industria alimentaria.

<b>Tipo de producto</b>	<b>Entero</b>	<b>Yema</b>	<b>Clara</b>
Confitería	X	X	
Pastelería	X	X	
Panadería	X	X	
Productos lácteos	X	X	X
Helados	X	X	X
Bebidas	X	X	X
Alimentos infantiles	X	X	X
Cremas y sopas	X	X	X
Mayonesa y salsas	X	X	X
Pastas alimenticias	X	X	
Platos preparados	X	X	
Charcutería	X	X	
Productos cosméticos			X
Pegamentos	X	X	X
Curtidos		X	X
Industria farmacéutica			X

Para la industria alimentaria y la restauración colectiva, los ovoproductos ofrecen algunas ventajas frente al huevo en cáscara:

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- Mayor versatilidad. Se pueden emplear los derivados apropiados para cada fin.
- Fácil empleo y dosificación.
- Evitan los inconvenientes derivados de la manipulación de las cáscaras (más trabajo: cascar y eliminar los residuos).
- Control de la seguridad bacteriológica.
- Manipulación más sencilla: fácil almacenamiento, ahorro de tiempo de preparación y de mano de obra.
- Facilitan la distribución (principalmente en los ovoproductos desecados, con muy poco volumen y peso, más fácil conservación y más duración).

Un adecuado procesamiento lleva a obtener materias primas óptimas para la elaboración posterior de alimentos y genera productos de alta calidad. Las etapas del procesamiento del huevo a fin de obtenerlo líquido, congelado o en polvo, se detallan en el esquema siguiente.

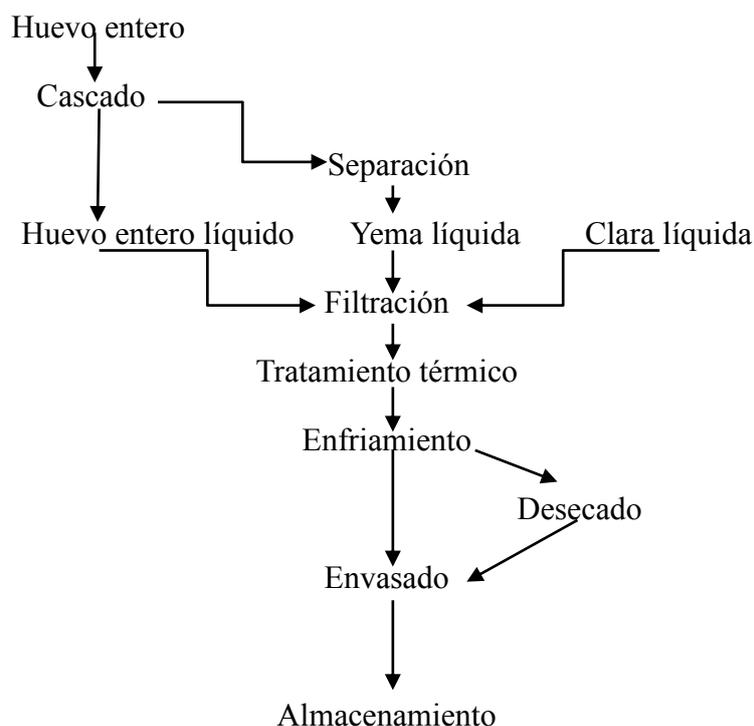


Figura 6. Proceso de elaboración de los ovoproductos (líquidos y desecados).

El ovopoducto que más se utiliza en la hostelería, restauración colectiva y en la industria alimentaria en España es el huevo pasteurizado, que se puede encontrar en el mercado como huevo entero líquido pasteurizado, yema líquida pasteurizada y clara líquida pasteurizada. Pueden ir con sal o azúcar u otros aditivos, según su uso o destino final, a petición del cliente. También es frecuente el uso de huevo cocido pelado y platos preparados y listos para su consumo, como

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

tortillas y revueltos. La pasteurización del huevo Los huevos utilizados deben cascarsse una vez que estén limpios y secos. Tras la rotura de la cáscara, se procede al tratamiento térmico, que consiste en mantener el huevo líquido a una temperatura entre 64-65°C durante 2 a 4 minutos, lo que garantiza la eliminación de los microorganismos patógenos que puedan encontrarse en el huevo líquido, principalmente Salmonella, así como el mantenimiento de las características físico-químicas y tecnológicas del producto (Rendueles, 20014).

### b) *Ovoproductos no destinados al consumo humano*

En las instalaciones avícolas se generan importantes cantidades de residuos de huevos, que deben ser gestionados adecuadamente para evitar descomposiciones debido a su almacenamiento prolongado, generando un problema sanitario.

Gracias las propiedades nutricionales del huevo aparecen nuevas alternativas de utilización de sus distintos componentes que van más allá de su valor nutricional clásico.

La utilización y el desarrollo de nuevas técnicas de fraccionamiento de ciertas proteínas de la clara y de la yema con propiedades biológicas interesantes pueden ser utilizadas y purificadas.

En el caso de la clara, su fraccionamiento supone una solución para la diversificación de las actividades de las explotaciones avícolas, debido a la posible aplicación de los compuestos obtenidos, tanto en el campo alimentario como en el farmacéutico. La albúmina de huevo se ha empleado en la elaboración de pinturas, cosméticos, ingredientes de medicinas, productos fotográficos, tintas, en el curtido del cuero, materiales hidratantes, jabones, champú, cemento, fibras artificiales, etc. La lisozima, debido a sus propiedades antibacterianas frente a células vegetativas como el *Clostridium* sp (se usa en la industria quesera y farmacéutica), la ovotransferrina, por sus propiedades antimicrobianas y la ovomucina, por su riqueza en restos glucosídicos, etc.

Con la yema se han desarrollado técnicas de extracción con disolventes orgánicos de las lecitinas o la fracción grasa de la yema. La lecitina de huevo se puede utilizar en la industria cosmética. Por otro lado, de la yema se puede producir hidrolizados mediante métodos químicos o biológicos generando péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. Este tipo de compuestos pueden tener aplicaciones no alimentarias, como fuente de fermentaciones, tales como los de levadura, caseína, etc., aplicados a cosmética y fertilizantes. Otros componentes que pueden ser extraídos y de los que se están realizando distintas investigaciones para diversas aplicaciones son la lipovitelina, la fosvitina, la fracción LDL, la livetina, etc.

Las cáscaras de huevo pueden ser recicladas, revalorizando este residuo mediante su centrifugación para recuperar las membranas adheridas. De esta forma las cáscaras se pueden conservar más fácilmente y por otro lado se pueden aprovechar las propiedades de las membranas para distintos usos alternativos.

Las membranas extraídas de la cáscara de huevo contienen colágeno, proteína usada en una amplia gama de productos médicos, ya que este promueve la coagulación de la sangre y proporciona la estructura sobre la cual las células pueden construir nervios, huesos y piel. Como se disuelve de modo natural en un cierto plazo, rara vez provoca rechazo, y no es tóxico, se utiliza comúnmente en cosméticos, sistemas de administración de fármacos y revestimientos biocompatibles.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En el caso de la revalorización de la propia cáscara de huevo, surgen distintas alternativas. Su alto contenido en carbonato cálcico hace de este residuo una posible fuente de calcio para ser utilizado en distintas dietas. Se han hecho algunos intentos de convertir las cáscaras de huevo en alimentos tanto para el hombre como para los animales, como fuente de calcio, especialmente en la alimentación de gallinas. Las harinas de cáscaras de huevo se elaboran extrayendo la membrana y desecándolas tan pronto como sea posible, posteriormente son calentadas a 80°C hasta conseguir su esterilización. Las cáscaras se trituran y pasan por un tamiz para evitar la sensación de arenosidad. El nivel de calcio en las raciones para gallinas es esencial para mantener la calidad de las cáscaras de los huevos producidos. El carbónato cálcico es fundamental en la avicultura de puesta, por lo que el residuo de la cáscara de huevo sirve mejor que cualquier otra fuente de calcio para este fin. Además, los aminoácidos derivados de la fracción no mineral de la cáscara están disponibles y según las investigaciones realizadas son utilizados eficazmente por las gallinas.

Como alternativas no alimentarias existe un amplio abanico de posibilidades para su revalorización. Destaca, la utilización como componente mayoritario en el mercado de envases ecológicos, esta alternativa ofrece materia prima más barata que el petróleo y mayor rapidez en los procesos de degradación de los envases.

Pueden ser incluidos como productos en la industria de la limpieza, desde su uso en formulaciones para cremas dentales hasta elaboración de productos de limpieza de fachadas o grafitis pasan o por su utilización para elaborar detergentes que utilizan la cáscara de huevo triturada finamente en soluciones con ácido láctico y otra serie de humectantes, lo que le conforma al detergente una característica abrasiva para limpiar superficies concretas (Nuevo, et al, 2014).

### 2.2 Melaza de caña de azúcar

Las melazas, son los residuos obtenidos en las cubas de extracción de los azúcares. La Norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel final o melaza (no cristalizable) al jarabe o líquido denso y viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales.

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en lo exprimido de la caña. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 4). Estos compuestos no fermentables reductores del cobre, son principalmente caramelos libres de nitrógeno producidos por el calentamiento requerido por el proceso y las melanoidinas que si contienen nitrógeno derivadas a partir de productos de condensación de azúcar y aminocompuestos (Ferrer, et al, 2004).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 4. Composición de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60 – 63 % p/p
	Azúcares reductores	3 – 5 % p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4 – 8 % p/p
	Agua	16%
	Grasas	0,40%
	Cenizas	9%
Contenido minerales	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Fósforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
Contenido de vitaminas	Colina	600
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

### 2.2.1 Obtención de la melaza

Las melazas se obtienen como un subproducto final en la elaboración del azúcar de caña. En la figura 7 que se explica a continuación:

#### a) Almacenamiento

La caña después de ser cortada es llevada a patios de almacenamiento. Este almacenamiento no debe ser muy prolongado, puesto que los efectos del sol disminuyen el rendimiento del exprimido, lo mismo que su calidad; por este motivo, debe pasarse a la molienda en el menor tiempo posible después de haber sido cortada; dentro de lo posible debe procurarse que este tiempo no sobrepase las 48 horas para evitar pérdidas.

#### b) Preparación y Extracción del exprimido

Ambas se llevan a cabo en una forma continua. Este proceso, se lleva a cabo en una serie de “cuchillas desmenuzadoras y molinos extractores”. La caña es desmenuzada con cuchillas giratorias y desmenuzadoras para facilitar una mejor extracción del zumo. La caña desmenuzada pasa a los molinos donde se efectúa el proceso de extracción del zumo; esta caña es rociada con agua a medida que sale de cada molino, de esta forma se diluye el azúcar y se obtiene un mayor rendimiento en la extracción. En esta forma, se extrae más del 90% del azúcar que hay en la caña, el 10% restante va a las calderas como combustible.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

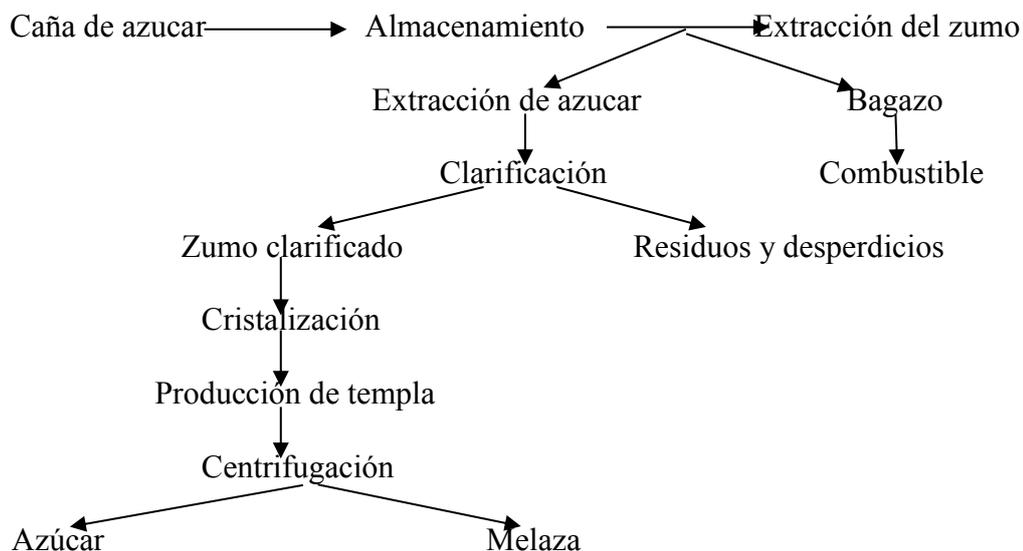


Figura 7. Principales pasos para la obtención de la melaza

### c) Clarificación

El zumo es bombeado de los molinos a los clarificadores por medio de bombas centrífugas hechas de materiales resistentes a la abrasión y a los ácidos. La clarificación se lleva a cabo por medio de cal y calor. La acidez del zumo es neutralizada con cal y luego se eleva la temperatura hasta su punto de ebullición. El precipitado que se forma por acción de la cal y el calor, se deja sedimentar en los tanques clarificadores continuos y el zumo clarificado es decantado de la espuma, barro y desperdicios y es llevado a la estación evaporadora.

### d) Evaporación

El zumo clarificado pasa a un evaporador de efecto múltiple sin ningún tratamiento previo. Los evaporadores consisten en una serie de techos de vacío, de tal manera que se logre la ebullición a temperatura más baja.

### e) Cristalización

Se hace en tanques de vacío de efecto simple a presión reducida. El jarabe o las aguas madres de cristalizaciones anteriores (melazas), se evaporan hasta su saturación de azúcar; en este punto, los granos son separados de la masa en ebullición y sirven como núcleo para la formación de cristales. El tanque es cargado a medida que el agua se evapora y su contenido de azúcar es depositado sobre los cristales presentes sin la formación de cristales adicionales. En este punto, la mezcla de cristales y jarabe, constituye una masa densa denominada “Templa”.

### f) Centrifugación

La Templa pasa a un mezclador y de allí pasa a centrífugas verticales de alta velocidad. Los cristales de azúcar son retenidos en la centrífuga y pueden ser lavados con agua si se desea. Las aguas madres que se separan, se denominan melazas de primera. Completada la centrifugación, se remueve el azúcar quedando la máquina lista para una nueva carga. El azúcar obtenido pasa a los depósitos para su almacenamiento, mientras que las melazas se envían a un nuevo evaporador y de ahí otra vez a la centrífuga donde se obtiene el azúcar y las melazas de segunda. Estas melazas se someten a un proceso similar a los anteriores, obteniéndose melazas finales. Estas melazas finales, se consideran ya un subproducto y al cual son muy pocos los usos que se le dan (Swan, et al,1990)

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.2.2 Composición

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, período de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener un pH de 5.0- 6.1%.

#### - Azúcares

Los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60% - 63% en peso), la glucosa o dextrosa (6% - 9% en peso), y la fructosa o levulosa (5% - 10% en peso); estas dos últimas constituyen la mayor porción de los azúcares reductores encontrados en los análisis. La fructosa puede sufrir transformaciones al igual que la glucosa, debido a reacciones dependientes de la temperatura. El contenido de glucosa y fructosa en las melazas puede variar a causa de la hidrólisis de la sacarosa, a valores de pH ácido y a temperaturas altas.

#### - No azúcares

Los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Pb}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ); el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes); y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos).

#### - Cenizas

En general la composición de las cenizas de las melazas, es cualitativamente similar a la del zumo exprimido de la caña. Los análisis muestran que el contenido de hidróxido de potasio varía alrededor de 40% del peso del carbono total de la ceniza; el contenido de cal es de 10% al 20%, el de sulfatos varía entre el 10% y el 20%, y las sales de magnesio, sodio, aluminio, la sílice, los cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro, completan el resto del contenido de cenizas.

#### - Compuestos nitrogenados

Están constituidos principalmente por aminoácidos, amidas ácidas, betaínas y pequeñas cantidades de peptonas y nitratos. Cuando los azúcares reductores, glucosa y fructosa, son sometidos a los procesos de clarificación, se producen reacciones entre los aminoácidos y estos azúcares, en las cuales se forman productos coloreados como las melanoidinas.

#### - Ácidos

El ácido aconítico, es el más abundante de los ácidos orgánicos presentes en la caña que se acumula en las melazas, representando aproximadamente el 6% del peso de sólidos en la melaza. Los ácidos málico y cítrico están presentes en cantidades apreciables en las melazas. El ácido Fórmico está presente como producto de descomposición; la mayoría de estos ácidos son metabolizados por los microorganismos, como fuente de carbono y no presentan problemas de inhibición de crecimiento.

#### - Vitaminas

Aquellas vitaminas resistentes a la acción del calor y de los álcalis, aparecen encontradas en las melazas. La niacina, ácido pantoténico y riboflavina, importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas.

#### - Fenoles y Compuestos volátiles

Los fenoles presentes en las melazas, provienen de la parte fibrosa de la caña, éstos se derivan de los ácidos hidroxicinámico y parahidroxibenzóico.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Es necesario tener en cuenta, que desde el punto de vista de la fermentación, algunos fenoles son indeseables, por presentar actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los microorganismos, a concentraciones de 0.5g/L. Los ácidos fenólicos que mayor actividad bacteriostática han demostrado son el cloragénico, el p-cumárico y el telúrico, estos dos últimos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de algunas bacterias (Castro, 1993).

### 2.2.3 Propiedades físico-químicas

La viscosidad de las soluciones saturadas de azúcar impuro, aumenta rápidamente con el contenido de impurezas debido al incremento de la concentración de sólidos. El efecto de las sales minerales sobre la viscosidad de las soluciones de azúcar es variable. Un enriquecimiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la viscosidad, mientras que un incremento de iones  $\text{K}^+$ , la disminuye. Los compuestos orgánicos de alto peso molecular, que no son azúcares, incrementan la viscosidad. Si se disminuye el contenido de aire en las melazas, disminuye la viscosidad. Cuando el pH es superior a 11 la viscosidad aumenta. La viscosidad de las melazas decrece a una temperatura dada.

Las melazas de caña de azúcar son ligeramente ácidas, tienen un pH entre 5.5 y 6.5 esto es debido a la presencia de ácidos alifáticos y al bajo pH de la clarificación. El pH de las melazas cambia con la temperatura y depende también de la naturaleza y de la cantidad de material estabilizador del pH que posea.

En las soluciones de azúcar, el calor específico depende de la temperatura, de la concentración y de la composición. Se puede decir que el calor específico disminuye al aumentar la concentración de las soluciones impuras de azúcar (Swan, et al, 1990).

### 2.2.4 Microorganismos de la melaza

Mediante soluciones diluidas de melazas, y su posterior uso como medio de cultivo se puede decir que, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*, hongos y bacterias como *Lactobacillus sp*, *Sporolactobacillus sp*, *Zymomonas sp*, *Micrococcus sp*, *Acetobacter sp* y *Gluconobacter sp*. Se considera importante la presencia de microorganismos mesófilos y termófilos dentro de la melaza. Los organismos mesófilos se desarrollan bien durante la dilución de las melazas. Además pueden contener microorganismos que pueden ser nocivos para la fermentación, el más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, el cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Bayona, et al, 2002).

Tabla 5. Microorganismos presentes en la melaza.

Microorganismos	Características
Bacterias Lácticas (medio MRS con azul de anilina y ciclohexamida)	Colonias redondas, convexas, bordes regulares, de color azul.
<i>Zymomonas</i> (medio WL con ciclohexamida y penicilina)	Colonias redondas, bordes regulares, de color verde oscuro.
<i>Zymomonas</i> (medio Standard con ciclohexamida y penicilina)	Colonias brillantes, bordes regulares y de color entre blanco y crema.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (medio Saboureaud)	Colonias redondas, color blanco cremoso.

### 2.2.5 Aprovechamiento de la melaza

Debido a que se trata de un subproducto de la elaboración de azúcar es importante conocer que usos puede tener dicho residuo para así disminuir su efecto negativo sobre el medio ambiente. Así, la melaza se usa como aditivo para mejorar las propiedades organolépticas o facilitar la reducción a comprimidos del alimento para el ganado de carne y de leche.

También ha sido utilizada como suplemento para el ganado en pastoreo solo o adicionado con otros componentes como urea y ácido fosfórico. Igualmente ha sido empleada como ingrediente alimenticio para pollos y cerdos, en donde constituye un subproducto de primer orden para su alimentación, ya que puede ser utilizada a niveles hasta de 40%, logrando alimentación adecuada en los animales. Por otro lado, se usa como fertilizante para suelos, mezclada con bagazo y otros componentes, en casos especiales de abundancia. También es frecuentemente utilizada como combustible, para la preparación de pavimentos (Ariza et al, 1997).

Tabla 6. Usos de la melaza.

UTILIZACIÓN	GENERALIDADES
Alimentos	Alimentación rica
Animales	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla con diversos alimentos, pulverizado de forrajes, suplemento de ensilajes.
Recuperacion de liquidos desazucarados	Vinazas para la obtención de Ácido glutámico. Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos.
Fermentacion	Levaduras para panificación. Ledeaduras para alimentación humana y animal: aditivo para piensos, extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácidos nucleicos. Ademas es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular. Grasas de levadura. Alcohol etílico. Productos colaterales de fermentación alcohólica.

## 2.3 Fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Carballo, 2000). La clasificación taxonómica de la levadura se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>Reino</b>	Hongo
<b>División</b>	<i>Amastogomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Endmycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Sacchaomycetaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Saccharomycetidae</i>
<b>Género</b>	<i>Saccharomyces</i>
<b>Especie</b>	<i>Cerevisiae</i>

Las levaduras son eucariotas unicelulares y se encuentran formados por pared celular, núcleo diferenciado y por orgánulos como ribosomas y mitocondrias. Las células son esferoidales, elipsoidales o cilíndricas. La reproducción vegetativa ocurre por mecanismos multilaterales; los pseudomicelios pueden ser formados por algunas especies, pero presenta ausencia de hifas verdaderas. Las características generales de las levaduras se resumen en la Tabla 7. (Tuite, et al, 1991).

Tabla 8. Características generales de las levaduras

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>LEVADURAS</b>
Dimensiones (micras)	4 – 8
Tiempo de duplicación (horas)	1 - 3
Ph (rango optimo)	4,5 – 5,5
Nitrógeno (%)	7,5 – 8,5
Proteína (%)	35 – 45
Acidos nucleicos (%)	6 – 12
Carbohidratos (%)	30 – 45

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados.



Figura 8. Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae*.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Sus dimensiones son: 2.5-10 micras de ancho y 4.5-21 micras de largo. Microscópicamente se observan redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas. Fermenta glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa y no fermenta lactosa. Asimila galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. Producen una fermentación y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales del extracto de carne, hace fermentar la masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites (Ariza, et al, 1997). En presencia del O<sub>2</sub> las cepas pueden metabolizar oxidativamente sustratos como glicerol, etanol y lactato.

*Saccharomyces cerevisiae* y otras especies de levaduras en general, realizan fermentación alcohólica, en la cual el etanol es formado a partir de la D-glucosa; éste azúcar es convertido en piruvato el cual es descarboxilado a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa y la tiamina pirofosfato y el acetaldehído reducido finalmente a etanol (Halasz, et al, 1991).

### - Requerimientos nutricionales

*Saccharomyces cerevisiae* requiere elementos que son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos y es necesaria una cantidad mínima de 70 mg/L para su correcto crecimiento (Colombié, et al, 2006); el fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP) y necesita alrededor de la concentración 0,23 g/L, mientras que de azufre requiere 0,24 g/L. (Genisheva, et al, 2013). Para que las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono presentes en el sustrato sean aprovechados por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable.

### - Requerimientos físico-químicos

El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido por un pH próximo a 4.0 – 5.0 sin embargo en un medio alcalino no se desarrollan bien. A pesar de la tolerancia bastante amplia de esta levadura para las variaciones de pH a partir de los sustratos habitualmente usados en los medios de cultivo forman productos en especial ácidos que influyen en el crecimiento celular. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial del medio a valores entre 4.0 y 4.5 se obtiene mejor crecimiento y utilización de glucosa, mientras que la máxima producción de enzima se observa a un pH de 3.0 (Tuite, et al, 1991).

## 2.3.2 Proceso de fermentación

La fermentación es el proceso en el que la glucosa se transforma en etanol y CO<sub>2</sub>. Es llevada a cabo por diversos microorganismos como levaduras, hongos y algunas bacterias. Proceso de fermentación más común es el llevado a cabo por *Saccharomyces*. Tiene diversas aplicaciones en la alimentación humana, como en la elaboración de pan, cerveza, vino y otras bebidas fermentadas.

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía en un ambiente anaerobio a los microorganismos unicelulares (levaduras), para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el etanol y CO<sub>2</sub> como desechos como consecuencia de la fermentación (Stryer, et al, 2007).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

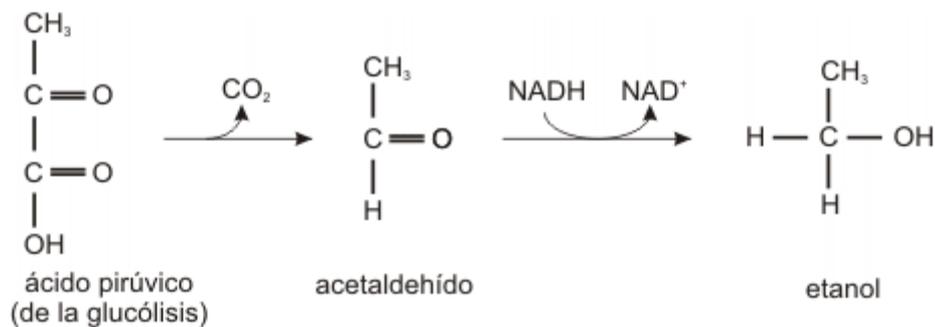
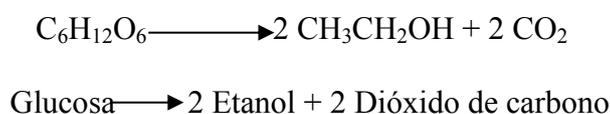


Figura 9. El ácido pirúvico formado en la glucólisis se convierte anaeróbicamente en etanol.

Las levaduras y algunas bacterias, descarboxilan el piruvato obtenido de la glicolisis dando acetaldehído, y éste se reduce a etanol por la acción del  $\text{NADH}_2$ . Siendo la reacción global:



Podemos decir que la fermentación alcohólica, además de un proceso anaeróbico, es también un proceso exotérmico, es decir, libera energía, así como moléculas de ATP, de las cuales se genera un total de dos moléculas por cada molécula de glucosa procesada. El balance energético de la fermentación puede expresarse de la siguiente forma:



La fermentación alcohólica en la industria se realiza de manera discontinua (en batch) en biorreactores y puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto, un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. En los procesos comerciales la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica (metabolitos primarios) o antes de que comience la fase de muerte (metabolitos secundarios) (Díaz, 2014).

### 2.4 Bebidas fermentadas y licores

Las bebidas fermentadas son el producto de la fermentación de diferentes tipos de sustratos, pudiendo ser cereales o fruta, las más comunes. Por ejemplo la cerveza, el vino o la sidra. La fermentación es llevada a cabo mayoritariamente por levaduras o bacterias lácticas. Los licores son bebidas alcohólicas obtenidas por destilación de diversas sustancias vegetales y una posterior aromatización, con un sabor dulce por su elevado contenido en azúcares. Algunos ejemplos son el licor de huevo y el ponche de huevo.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.4.1 Cerveza:

La cerveza es una bebida de bajo contenido alcohólico (2,5 % - 11,5% v/v) generada a partir de la fermentación de malta, lúpulo y agua con levaduras del género *Saccharomyces*. Hay muchos tipos de cervezas pero se pueden clasificar en ale y lager, según las levaduras suban a la superficie o sedimenten. Hoy en día la mayoría de las fermentaciones se llevan a cabo con levaduras que al final de la fermentación van al fondo del tanque y son las de tipo lager.

La cervecería tiene dos sectores bien definidos para elaborar cerveza: la producción de malta, que es la materia prima fundamental y la producción de cerveza.

La producción de malta comprende las siguientes operaciones: recepción de cebada, clasificación y limpieza, remojo, germinación, secado, pulido, clasificación y limpieza de la malta terminada y almacenamiento. Durante la germinación el endosperma de la semilla se degrada parcialmente por las enzimas que atacan a las paredes celulares, gránulos de almidón y proteínas. Por tanto el proceso de malteado es muy necesario porque hace digerible almidón y proteínas para las levaduras, pudiendo así estas llevar a cabo la fermentación.

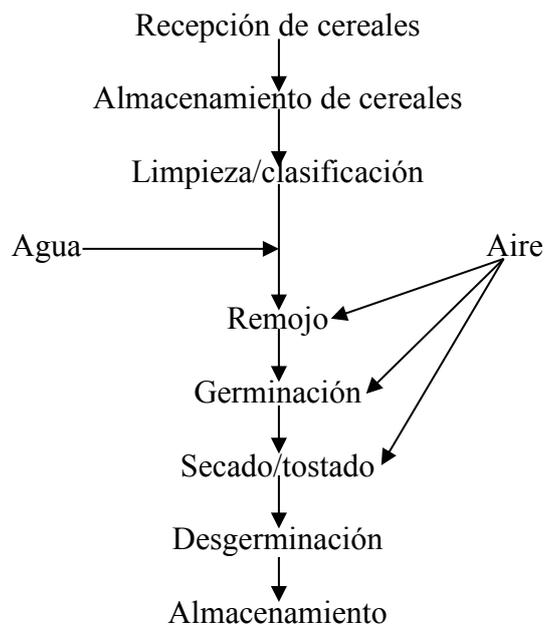


Figura 10. Producción de la malta.

La producción de la cerveza comprende de manera esquemática los siguientes pasos:

- Moler la cebada malteada, convirtiéndola en harina basta, lo que aumentará la superficie de contacto con el agua para la digestión del almidón. Es importante que la cáscara de los granos de malta se mantenga lo más intacta posible, ya que así actúan a modo de filtro permeable durante la recuperación del mosto.
- Durante la maceración, se añade esta harina a un tanque y se llena con agua caliente a unos 70°C. En el fondo del tanque aparecerá una especie de papilla y en la superficie sólidos

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

flotantes, que podrán separarse del extracto acuoso llamado mosto dulce. Según se van hidratando las partículas del endosperma comienzan a actuar nuevamente las enzimas, concretamente la  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, que degradan la amilosa y la amilopectina y producen azúcares fermentables. Los aditivos pueden ser empleados ya que son una fuente más barata que la malta, tienen un menor contenido en compuestos nitrogenados por lo que estos compuestos se diluirán mejor. Además estos aditivos le dan un sabor más refrescante y más estable una vez envasada.

- Posteriormente el mosto se enfría y airea, en intercambiadores de calor cerrados de placas, hasta convertirlo en un medio ideal para el desarrollo y la fermentación de las levaduras. Fermentar el mosto con las levaduras, hasta que la mayoría de los carbohidratos se hayan convertido en alcohol y anhídrido carbónico. En el caso de las cervezas de tipo ale la fermentación dura aproximadamente 72 horas a temperaturas altas, mientras que las de tipo lager se producen a temperaturas más bajas pero el proceso dura entre 7 y 8 días.
- Las etapas post fermentativas consisten en madurar el mosto para que así el diacetilo generado por las levaduras en la fermentación sea transformado en 2-3 butanodiol, eliminándose así el sabor a mantequilla. Y clarificar la cerveza, modificando el sabor y el aroma, pero manteniendo las cualidades de la misma. Finalmente se puede envasar la cerveza, una vez pasteurizada, en grandes tanques o a barriles estériles.

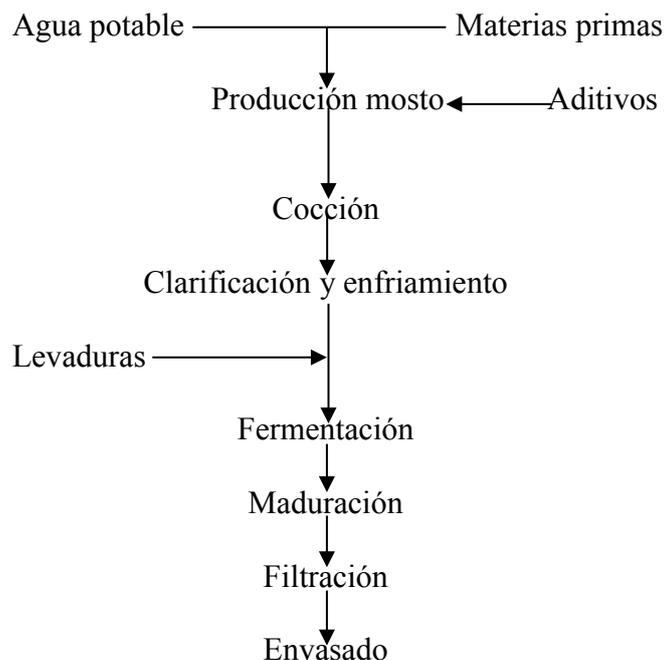


Figura 11. Producción de la cerveza

El mosto junto con el lúpulo es un medio rico, contiene carbohidratos asimilables, una amplia variedad de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, sales minerales como el calcio, sodio, potasio, hierro, cinc, cobre, magnesio, cloruros, sulfatos, carbonatos y fosfatos. También aparecen vitaminas como la biotina, ácido pantotéico, inositol, tiamina, pridoxina y ácido nicotínico.

Tras la fermentación la composición varía y se caracteriza sobre todo por la aparición de compuestos volátiles como el etanol y otros alcoholes de alto peso molecular (100-200mg/L), ésteres (25-40 g/L), ácidos (15 g/L), aldehídos (48 g/L) y cetonas (3 g/L). Por el contrario los

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

compuestos fuertemente aromáticos como el diacetilo deben aparecer en un rango de 0,1- 1 ppm y los niveles de sulfuro de dimetilo han de estar entre 15-150 microgramos por litro (García, 2014)

### 2.4.2 Sidra natural

La sidra es una bebida alcohólica de baja graduación (3 % - 8 % v/v) fabricada con el zumo fermentado de la manzana, en este caso la fermentación la realizan los propios microorganismos presentes en la fruta, mayoritariamente levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y por bacterias lácticas.

La fruta sufre una clasificación en base a sus propiedades organolépticas, tales como el contenido en compuestos fenólicos o acidez total. Según esto, las manzanas se podrían clasificar en:

- Dulce: bajo contenido en ácidos y taninos.
- Dulce-amargas: aquellas que poseen un elevado contenido en taninos, pero bajo en ácidos orgánicos.
- Ácido-amargas: cuya composición es elevada en los dos grupos de compuestos.
- Amargas: son los que poseen una elevada concentración de taninos y baja en ácidos.

La elaboración de la sidra natural comienza con la recogida y el lavado de la manzana. La manzana después de ser almacenada, es transportada a una tolva que a su vez la descarga en una balsa de prelavado, después a una máquina de lavado y por último pasa al sinfín de aclarado. La manzana una vez aclarada pasa por una cinta, en la que manualmente se desecha la no apta. Este paso consiste en seleccionar la manzana apta para el triturado y desechar la que no presente las condiciones correctas.

La manzana es triturada por molinos de martillo o de cuchillas de rodillo, se obtiene la magaya (pulpa molida). Previo al prensado se realiza una maceración de la pulpa molida con el fin de aumentar el rendimiento del posterior prensado y favorecer el desarrollo de aromas propios del producto, en este paso se extraen los elementos solubles de la pulpa. En el prensado se extrae el mosto de la manzana, tradicionalmente se han empleado sistemas de extracción lento, usando prensas de cajón, en la actualidad se están introduciendo prensas neumáticas, lo que supone la aplicación de sistemas de extracción rápida.

Antes de la fermentación es necesaria una clarificación del mosto para eliminar partículas en suspensión y la turbidez, con esto se disminuye la tasa de microorganismos y se regula la velocidad del proceso fermentativo, con una menor pérdida de aromas y de CO<sub>2</sub>.

El mosto previamente enfriado, se transporta por medio de bombas a los toneles, allí permanece varios meses, dependiendo de la época en que fueron llenados la fermentación es más rápida o más lenta. En este paso ocurre una fermentación alcohólica, donde las levaduras transforman el azúcar del mosto en etanol y CO<sub>2</sub>. Tras esta fermentación es necesario el trasiego, esta operación se realiza durante los menguantes de enero, febrero y marzo, y consiste en el mezclado de los toneles, esto se hace por dos motivos, el primero para eliminar los posos (borras) que se forman en el fondo del tonel, procedentes de la decantación del mosto y el segundo para unificar los mostos.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

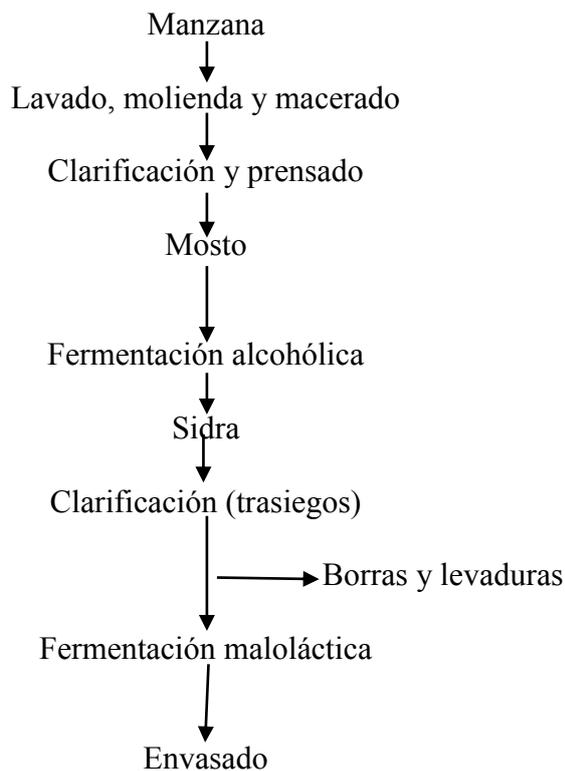


Figura 12. Proceso de elaboración de la sidra natural.

En la sidra tiene lugar otra fermentación a parte de la alcohólica, se trata de la fermentación maloláctica, se denomina maduración de la sidra su duración varia de semanas a meses, es llevada a cabo por bacterias lácticas y llevan a cabo la transformación de ácido málico en ácido láctico. Durante dicho proceso se produce un descenso de acidez, mejoran las propiedades organolépticas y aumenta la estabilidad biológica.

Finalmente la sidra puede ser embotellada, se realiza durante todo el año consiste en el llenado, encorchado y etiquetado de las botellas.

Como principales productos de la fermentación alcohólica se podrían destacar los ácidos orgánicos, que son en su mayoría productos finales del metabolismo de las levaduras aunque posteriormente pueden sufrir transformaciones por reacción química, como es el caso de los ácidos láctico, succínico y málico que generan respetivamente lactato de etilo, succinato de dietilo y malato de dietilo. Sin embargo, en el caso del ácido málico la vía más importante de transformación es por la acción de las bacterias ácido lácticas que lo transforman en ácido láctico y  $\text{CO}_2$ , durante la fermentación maloláctica. El ácido acético, aunque puede ser producido en bajas concentraciones por las levaduras, cuando se encuentra en el medio en concentraciones elevadas es debido a la presencia en el medio de bacterias acéticas y constituye un déficit en la calidad de la sidra. Los aminoácidos son consumidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica y devueltos parcialmente al medio al final de la misma por la lisis de las levaduras (García, 2014, Alonso-Salces, et al, 2004; Alonso, 2004)

Las características organolépticas de las sidra vienen dadas por: (Suárez, 2006)

- Acidez volátil inferior a 2 (g. ácido acético /L)
- Anhídrido sulfuroso total inferior a 100 (mg/L)
- pH entre 3 y 4

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- Ácido láctico entre 4 y 5 (g. ácido láctico /L)
- Etanol entre 3 y 8 (% v/v)

### 2.4.3 Vino

El vino es la bebida alcohólica procedente de la fermentación del zumo de uva. Su elaboración consta de los siguientes pasos:

- Vendimia:** Consiste en recolectar los racimos de uvas del viñedo, cuando estos han alcanzado el grado de madurez adecuado para vinificación (contenido en azúcar > 180 g/L)
- Recepción:** La uva no debe esperar muchas horas para entrar en la bodega, porque puede empezar a fermentarse y debe procesarse conforme vaya llegando.
- Lavado:** Una vez ingresada la materia prima se realiza una etapa de higiene para que la materia prima sea liberada de impurezas.
- Estrujado y despalillado:** consiste en romper el hollejo de la uva para que se libere el zumo y la pulpa. Esta operación se debe realizar cuidando que no se deshagan los hollejos ni se trituren las pepitas y los raspones, ya que estos darían una gran astringencia. Durante el estrujado o molienda se propicia la dispersión y desarrollo de las levaduras contenidas en los hollejos y contribuye a extraer los taninos y otras sustancias. El despalillado consiste en separar el raspón del resto dado que el raspón contiene una elevada cantidad de agua y sustancias astringentes que podrían pasar al vino, además, de esta forma se ahorra espacio y posibles pérdidas de alcohol absorbidas por el raspón.
- Encubado del mosto:** Consiste en colocar el mosto en las cubas, dejando vacío un 20% del volumen total para que el recipiente no desborde en la fermentación. Estas cubas pueden ser de cemento, madera o acero inoxidable.
- Sulfitado:** Consiste en añadir anhídrido sulfuroso al mosto y se trata de una operación totalmente necesaria si se quiere evitar el picado. El SO<sub>2</sub> en el mosto se combina con algunos componentes del mismo y solo la parte libre tiene acción protectora.
- Fermentación alcohólica:** Es el proceso donde el azúcar del mosto se transforma principalmente en alcohol y en gas carbónico por la acción de las levaduras, tiene duración de 3 a 5 días. Además sucede la maceración en donde el zumo de la uva estará en contacto con las partes solidas del grano como el hollejo y la semilla, que aporta al vino sus características específicas: color, taninos, componentes del extracto y aromas.
- Descube:** Consiste en separar el mosto de la parte solida u orujos. El descube se realiza cuando la densidad del mosto llega entre 1015 y 1010. Este vino se denomina vino de gota.
- Trasiego:** En los vinos nuevos se produce una clarificación y por eso se realiza el trasiego que consiste en separar el vino de los sedimentos a otro recipiente limpio. La fermentación maloláctica se realiza por la fermentación de las bacterias malolácticas que actúan sobre el ácido málico formando ácido láctico, esto disminuye la acidez y por lo tanto suaviza el vino, este proceso se lleva a cabo a una temperatura aproximada de 15 °C.
- Clarificación:** En este proceso se incorpora al vino un clarificante orgánico mineral, arrastra

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

partículas del vino que se encuentran en suspensión hacia el fondo del recipiente.

- k) Filtración: Se pasa el vino a través de un filtro que deja pasar solo el líquido reteniendo en su superficie las partículas.
- l) Estabilización: Se adiciona anhídrido sulfuroso para evitar oxidaciones, desarrollo de levaduras que aún permanecen en el vino y de bacterias contaminantes. La cantidad a adicionar depende de la cantidad de alcohol y de la cantidad de azúcar.
- m) Embotellado: se coloca el vino en botellas para su comercialización y generalmente se utilizan botellas oscuras y corchos de alcornoque.

El vino se caracteriza por tener graduación alcohólica mínima de 11,5 % vol. para los vinos tintos y 10,5 % vol. para los rosados y blancos. La acidez volátil máxima es de 0,05 g/L (0,833 miliequivalentes por litro) por cada grado de alcohol adquirido y, en cualquier caso, no podrá exceder de 0,8 g/L, salvo en el caso de vinos blancos y rosados dulces y semidulces para los que se fija un límite de 1,5 g/L (25 miliequivalentes por litro). La acidez total no será inferior a 3,5 g/L (46,6 miliequivalentes por litro) de ácido tartárico. Y los azúcares residuales no deberán superar los 4 g/L (García, 2014, es.riojawine.com)

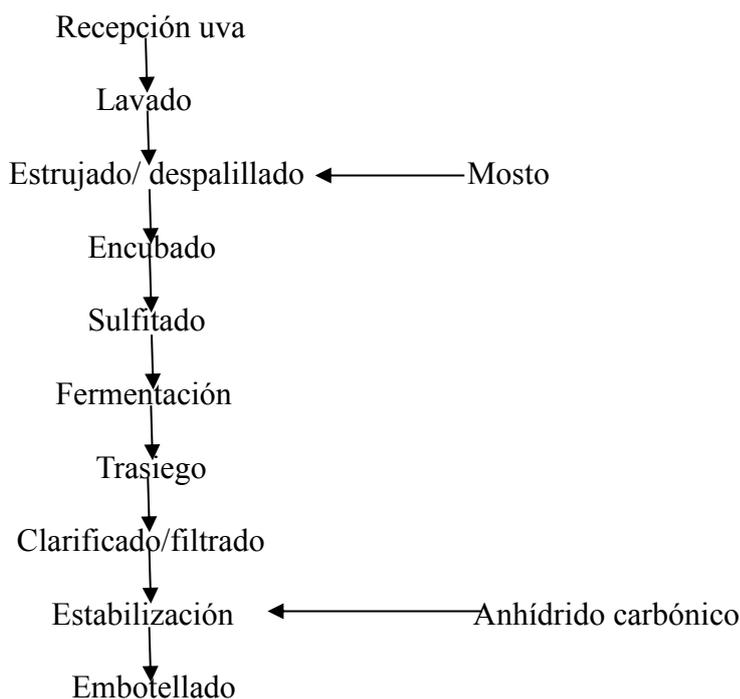


Figura 13. Elaboración del vino.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.4.4 Sake

El sake es una bebida alcohólica obtenida a partir de la fermentación de arroz, cuya concentración de alcohol está entre el 15 y el 20 % (v/v). En los países asiáticos la abundancia natural del arroz debido a las características climáticas permite que se pueda emplear en la elaboración de fermentaciones alcohólicas en forma de bebida.

Los principales microorganismos empleados en la elaboración de esta bebida alcohólica a base de arroz son *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Saccharomyces sake*. La fermentación dura un periodo que va desde los 30 a los 40 días.

Las principales etapas del proceso de producción del sake son:

- a) Molienda: La porción exterior del arroz se elimina por molienda con el objeto de quitar las grasas y proteínas que causan sabores no deseados.
- b) Tratamiento con vapor: El arroz se trata con vapor para que las enzimas presentes en el hongo de koji puedan descomponer los almidones fácilmente.
- c) Koji (arroz fermentado): El hongo koji se pulveriza sobre el arroz tratado con vapor para hacer koji. El koji se encarga de descomponer los almidones presentes en el arroz y los convierte en azúcares.
- d) Cultivo inicial de levadura: Se crea a partir del arroz tratado con vapor, el koji y el agua. La levadura desempeña el papel importante de convertir el azúcar en alcohol. Después de que el cultivo inicial de levadura está listo, al mismo se le adicionan, en tres etapas, más arroz tratado con vapor, koji y agua. No se adicionan todos de una vez debido a que, si se hiciera esto, la concentración se diluiría, y sería más fácil la proliferación de bacterias no deseadas. El almidón se convierte en azúcar y el azúcar se convierte en alcohol simultáneamente y en el mismo tanque. Esto se conoce como fermentación múltiple en paralelo.
- e) Prensado: La fermentación alcohólica termina después de que han transcurrido 20 días, aproximadamente. A continuación el mosto se prensa en una máquina que separa el sake de los sólidos sin fermentar, conocidos como kasu.
- f) Maduración: Con el objeto de mantener la calidad, el sake se calienta momentáneamente a 65° C con el objeto de matar a todas las bacterias. A continuación se almacena para permitir que los componentes del sabor maduren.

En el sake los principales componentes responsables de su sabor característico son: ácido succínico (500 a 700 mg/L), ácido málico (200 a 400 mg/L), ácido cítrico (100 a 500 mg/L), ácido acético (50 a 200 mg/L), isoamil alcohol (70 a 250 mg/L), n-propanol (120 mg/L), 2-fenil etanol (75 mg/L), isobutanol (65 mg/L), etilacetato (50 a 120 mg/L), etilcaproato (10 mg/L) e isoamil acetato (10 mg/L). También hay que añadir a estos componentes el etilleucinato, que es el que contribuye en mayor medida al aroma del sake. No hay que olvidar la presencia de ácido láctico (0,3 a 0,5 mg/L) que es casi enteramente fruto de la actividad de las bacterias fermentadoras acidolácticas presentes durante la etapa inicial en la cuba de fermentación. También se detecta, aunque en concentraciones menores, una variedad de aminoácidos, la presencia de estos tiende a ser la mínima posible, ya que le dan al sake un sabor desagradable.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

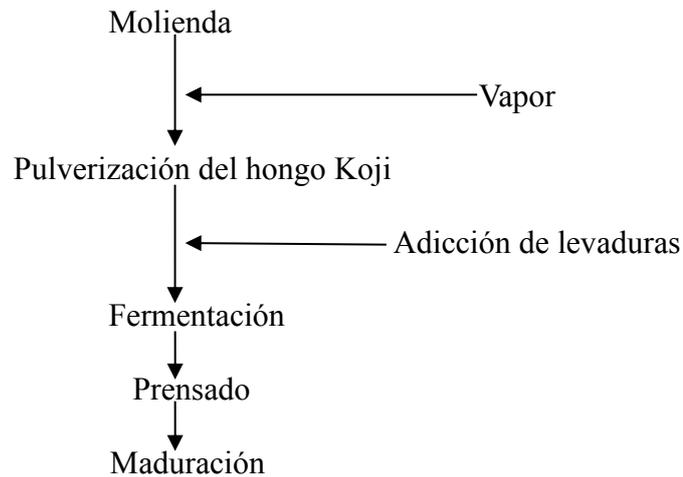


Figura 14. Proceso de elaboración del sake.

Se han llevado a cabo gran cantidad de mejoras genéticas de las cepas de *Saccharomyces sake* con tal de incrementar la presencia de algunos de estos metabolitos, al igual que reducir la de otros. También se han dado el caso de cepas diseñadas para mejorar la productividad, ya sea disminuyendo la formación de espuma, el incremento de tolerancia al etanol o la no proliferación de cepas productoras de toxinas.

### 2.4.5 Fermentación alcohólica de leche

La leche en la gran mayoría de sus derivados lácteos sufre una fermentación láctica, sin embargo en otros caso puede dar lugar a alguna bebida alcohólica. El proceso es alimentado por la lactosa (azúcar natural de la leche) y por la enzima lactasa que segregan algunas levaduras específica. La fermentación láctica y etílica es muy sensible a la temperatura y suele denominarse fermentación heteroláctica. Entre las bebidas lácteas que han sufrido una fermentación etílica se encuentra una bebida denominada koumiss (muy popular en países de Asia Central como en Kazajistán) que se elabora mediante la adicción de sacarosa, procedente del azúcar de caña, a la leche pasteurizada y suele proporcionar bebidas de bajo contenido alcohólico, oscila entre 1% - 3% (v/v), el microorganismo responsable de este proceso es *Lactobacillus bulgaricus*. Se denomina a veces como "vino de leche" y posee un aspecto grisáceo. En estas bebidas lácteas la fermentación láctica se produce al mismo tiempo que la alcohólica ([diccionario.sensagent.com](http://diccionario.sensagent.com)).

### 2.4.6 Hidromiel

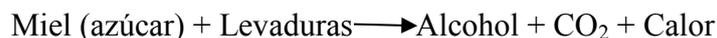
La hidromiel es una bebida alcohólica elaborada a partir de miel y agua, cuya concentración de alcohol varía entre el 10-15% (v/v). Las principales etapa de la producción de hidromiel son:

- a) Cocción: La preparación del mosto o la cocción, es el principio del proceso de elaboración de hidromiel. Se comienza agregando la miel al agua, es recomendable calentar la miel para favorecer su disolución. Al líquido resultante se lo llama mosto. Si se desea elaborar hidromiel afrutada, se deberán agregar las frutas o hierbas lavadas. El mosto es conveniente

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

realizarle un tratamiento térmico para prevenir contaminaciones, eliminar turbidez y mejorar la calidad final de la hidromiel. Al terminar cualquiera de los procesos de calentamiento elegido, es necesario enfriar el mosto a temperatura ambiente (temperatura cercana a 25°C). Una vez obtenida una temperatura cercana a los 15°C.

- b) Fermentación: La fermentación es esencialmente un proceso llevado a cabo fermentador, es aquí donde el azúcar que está presente en la miel, es transformada por acción de las levaduras en alcohol y CO<sub>2</sub> (desprendiendo calor).



Durante este proceso se producen transformaciones que repercuten en la calidad del producto final, por tanto se debe realizar teniendo en cuenta diferentes variables como el oxígeno que está presente en el mosto (hidromiel dulce sin fermentar), la temperatura y la acidez.

- c) Trasiego: Una vez finalizada la fermentación se deben separar los sedimentos, que están constituidos por levaduras y materia orgánica. Esta operación permite que no varíen las características organolépticas del producto final, haciendo que disminuya su calidad.
- d) Maduración: Una vez realizada la separación de los sólidos, se continúa con la fermentación del líquido, pero ésta se realiza de un modo mucho más lento ya que la cantidad de azúcar remanente en el mosto es muy poca y la cantidad de levaduras disminuye debido al trasiego. Es donde mejoran los aromas y las características organolépticas de la hidromiel (Casamiquela, et al, 2008).

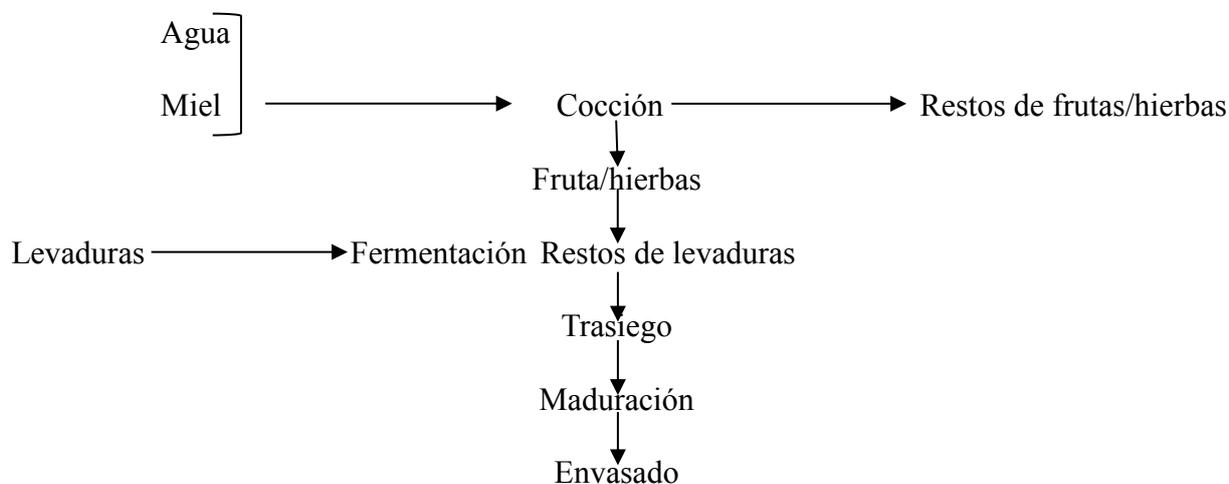


Figura 15. Proceso de elaboración de la hidromiel.

Algunos compuestos que provienen de la etapa de fermentación son el 1-3 y 2-3 butanodiol, 2-feniletanol. Se encuentran en grandes cantidades como en el vino, pero no contribuyen de manera importante en el aroma. Aparecen compuestos de la familia de los esteres como el citrato de etilo, succinato de etilo y lactato de etilo. También hay que destacar la presencia de lactonas, en grandes cantidades, ya que son sustancias que aportan sabor. Su concentración aumenta durante la etapa de envejecimiento (Carmona, et al, 2002).

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.4.7 Licor de huevo:

El licor de huevo es una bebida alcohólica a partir de huevos de gallina con un contenido de alcohol del 20% vol. La elaboración se efectúa en una mezcladora emulsionadora donde se añaden las yemas primero. El licor de huevo no debe de guardarse demasiado tiempo y estar protegido de la luz solar. La cantidad de alcohol (96%) y en la que se disuelven el resto de los ingredientes aromatizantes se mezclan con el resto del agua, se calienta hasta los 50-55C durante una hora u hora y media. No debe superar esa temperatura ya que el huevo se corta y forma una pasta granulosa. La clara se bate a punto de merengue y se mezcla con las yemas y para aromatizar los licores de huevo se usan destilado de vino, aguardiente de vino, vainilla, destilado de limón, aguardiente de cerezas(Vericad,2004).

### 2.4.6 Ponche de huevo

El ponche de huevo es una bebida alcohólica, típica de la época navideña, elaborada con la mezcla de algún licor, normalmente brandy o ron, leche, huevos y azúcar, además de especias como la canela, la nuez moscada y vainilla. Cuya concentración de alcohol varía entre un 25-30% (v/v). Para su elaboración se procede a la recogida y selección de los ingredientes. Se baten las yemas de los huevos, se añade azúcar, hasta que el líquido quede cremoso. Se continúa batiendo y se le agrega leche lentamente, a dicha mezcla se le añaden las diferentes especias antes mencionadas y se le agrega brandy o ron blanco, esto le da la graduación alcohólica, ya que en este caso no hay ningún tipo de fermentación. Finalmente es enfriado y envasado para su posterior consumo (Zurdo, et al, 2014).

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Obtención y caracterización del medio a fermentar.

##### 3.1.1. Fraccionamiento de la yema de huevo

El medio empleado como sustrato para el proceso fermentativo ha sido la fracción acuosa resultante de separar de la yema los gránulos y los lípidos del plasma de aplicación en el sector de la alimentación y cosmética (Laca et al., 2010).

Para el fraccionamiento se utilizaron huevos de gallina Leghorn, marca “Asturiana de Huevos”. Estas gallinas tienen una alimentación a base de pienso y están en régimen de producción intensiva.

Inicialmente, se separa la yema del huevo y con cuidado de eliminar los restos de albumen se vierte en un recipiente. Una vez que tuvimos todas las yemas separadas se diluyen con agua 1:1,5 v/v. A continuación se añadió NaOH 1 N (PANREAC) hasta alcanzar pH 7 y se mantuvo durante toda la noche a 4°C. Durante este tiempo en reposo se busca el desacople de las proteínas de la yema por la acción del sodio en los puentes de calcio, para la obtención de las fracciones respectivas. Posteriormente, se centrifugó durante 45 minutos a 4°C y a 10.000 G. Aquí obtuvimos un precipitado que contenía los gránulos (Fracción 1) y un sobrenadante, denominado plasma.

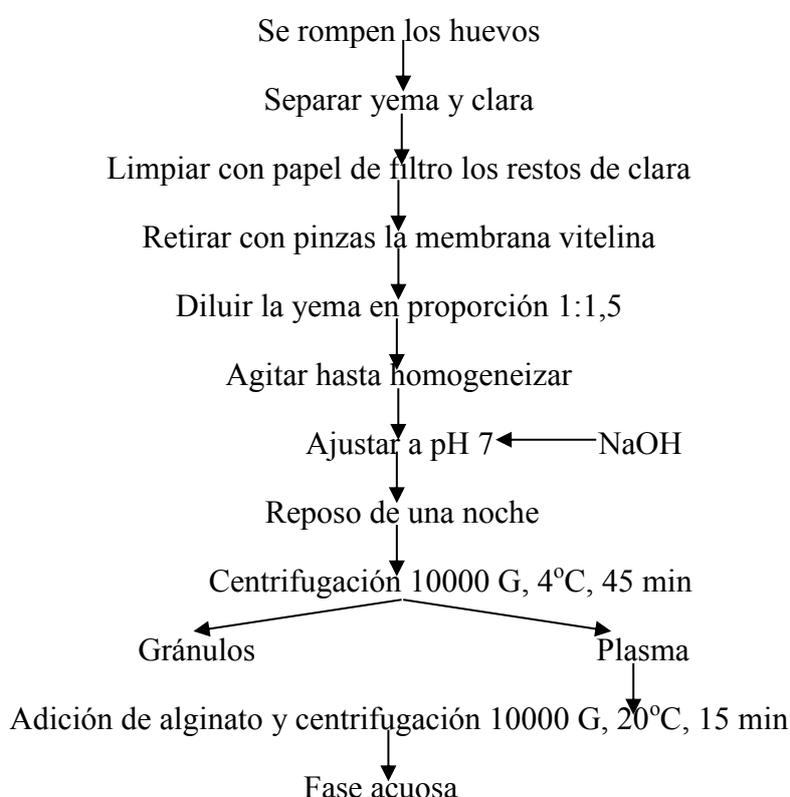


Figura 16. Proceso de fraccionamiento de la yema de huevo

## MATERIAL Y MÉTODOS

Este sobrenadante se mezcló homogéneamente con alginato de sodio 1% (Alginatic Acid, Sodium Salt de ACROS organics) y se centrifugó 15 minutos a 20°C y a 10.000 G. El alginato permite separar los lípidos que forman una capa viscosa en la parte superior, se trata de la fracción lipídica (Fracción 2) que se separó, quedando la fracción acuosa (Fracción 3).

Finalmente esta fase acuosa se filtró utilizando un matraz kitasato conectado a una bomba de vacío, para eliminar los sólidos suspendidos. La fracción así obtenida es la que se utilizó como base en la fermentación llevada a cabo en este trabajo. Para su conservación se mantuvo congelada hasta su uso.

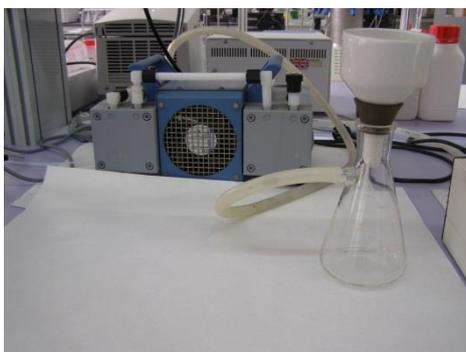


Figura 17. Matraz kitasato y bomba de vacío

### 3.1.2. Caracterización del medio

Para la caracterización de la fase acuosa de la yema de huevo se emplearon métodos de análisis físico-químico y microbiológicos.

#### *Análisis físico químicos:*

Los ensayos físico químicos empleados en la fracción acuosa de la yema de huevo se realizaron por triplicado.

#### - Determinación de proteínas:

El método Kjeldahl se utiliza en química analítica para la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas lo cual es de gran interés en el ámbito alimentario.

Es el método más usado y se efectúa mediante la determinación de nitrógeno orgánico. Todos los tipos de proteínas coinciden todas en una proporción similar de dicho nitrógeno orgánico. Se utiliza el factor de cálculo siguiente:

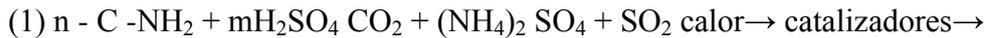
$$\text{Contenido de proteínas} = \text{Contenido de nitrógeno orgánico} \times 6.25$$

## MATERIAL Y MÉTODOS

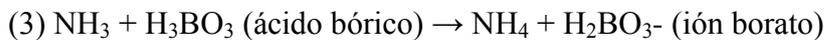
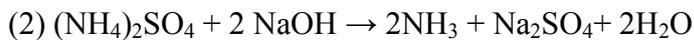
En esta técnica se digieren las proteínas y otros compuestos orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio mediante la digestión. La mezcla resultante se neutraliza con una base y se destila. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico. Los aniones de borato así formado se valoran con HCL estandarizado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra ([www.utadeo.edu.co](http://www.utadeo.edu.co))

El método consta de tres etapas: digestión – destilación – valoración.

### Digestión



### NEUTRALIZACIÓN Y DESTILACIÓN



### Valoración

El anión borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno) es titulado con HCl (o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) estandarizado:



Según la cantidad de mL gastados en viraje de color podemos calcular la cantidad de nitrógeno detectado.

$$\text{mg/ Nitrogen} = (T-B) \times N \times 14,007 \times 100 / \text{volumen de muestra}$$

$$\text{mg/l Proteína} = \text{mg/l Nitrógeno} \times F$$

Siendo:

T = Volumen de HCl consumido en la valoración. (mL)

N = Normalidad del HCl

B= Volumen de HCl consumido en la valoración del blanco. (mL)

F = Factor de conversión para pasar de contenido en nitrógeno a contenido en proteínas. Para la proteína bruta acostumbra a usarse un valor de 6.25. Para mayor exactitud, distinguiendo la calidad de la proteína según la naturaleza de la muestra, pueden emplearse otros factores de conversión.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### - Determinación del contenido de azúcares

Para la determinación del contenido de azúcares se usó el Método Rebelein, basado en las propiedades reductoras de la glucosa y la fructosa. En presencia de estos azúcares, el  $\text{Cu}^{+2}$  se reduce a  $\text{Cu}^{+}$  en medio alcalino y en ebullición, valorándose posteriormente los iones  $\text{Cu}^{+}$  en exceso. Permite la cuantificación de azúcares accesibles para los microorganismos reductores, como glucosa y fructosa, y también de la sacarosa ya que se realiza una hidrólisis previa.

Para llevar a cabo el análisis en un matraz Erlenmeyer se introducían 2,0 mL de muestra, 10,0 mL de solución cúprica 0,168 mol/l VINIKIT (cód. 624582) y algunos gránulos de piedra pómez QP (cód. 211835). La mezcla se calentaba sobre placa calefactora hasta ebullición manteniéndola durante 2 min. En ebullición, se añadían, 5 mL de solución alcalina (Potasio Sodio Tartrato) 0,886 mol/l VINIKIT (cód. 624573) y se mantenía en ebullición durante 1,5 min más. A continuación, se enfriaba bajo un chorro de agua fría y se añadían con probeta 10 mL de yoduro de potasio (30% p/v) VINIKIT (cód. 624572), 10 mL de ácido sulfúrico solución (16% v/v) VINIKIT (cód. 624570) y 10 mL de almidón al 2% VINIKIT (cód. 624567). La solución resultante se valoraba con tiosulfato de sodio 0,0551 mol/l (0,0551N) VINIKIT (cód. 624576) hasta coloración crema claro o gris-amarillo. Como blanco se preparó una solución de igual manera sustituyendo la muestra por agua destilada (Panreac, 2010)



Figura18. Muestra más solución cúprica



Figura 19. Adición de solución alcalina



Figura 20. Adición de yoduro de potasio



Figura 21. Adición de almidón.

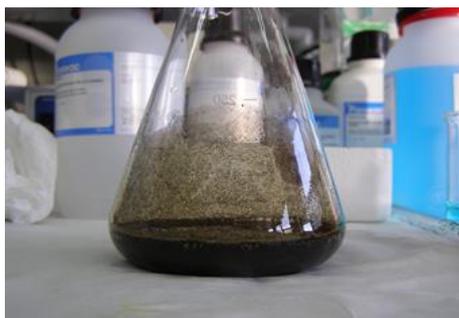


Figura 22. Valoración con tiosulfato de sodio.

La diferencia entre el volumen  $v$  de tiosulfato gastado en el blanco y el  $v'$  gastado en la muestra nos da el contenido de azúcar expresado en g/L (con un decimal). Azúcar total,  $\text{g/L} = (v - v')$ .

- Determinación del contenido de azufre y fósforo

Para analizar el contenido en P y S, se utilizó un espectrómetro de masas HP 7500c (Agilent Technologies), medida realizada por los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo.

Se disolvió la muestra con  $\text{HNO}_3$  en horno microondas. Para la determinación por ICP-MS se diluyeron dos alícuotas 1:10 con  $\text{HNO}_3$  al 1% y se añadió Rh en concentración de 10 ppb. El Rh se empleó como patrón interno. Se midieron las muestras en el ICP-MS ELEMENT2. La determinación de la concentración se llevó a cabo con calibrado en  $\text{HNO}_3$  1% y Rh como patrón interno.

- Determinación de contenido de carbono orgánico

El equipo empleado para realizar el análisis de carbono orgánico total (TOC) es un TOC-V CSH (Shimadzu). Este equipo mide el carbono orgánico total por diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico. Es necesario un calibrado inicial con el talato ácido. Para inyectar la muestra, se conecta el equipo y se adaptan los parámetros. Se hicieron diluciones 1:100 con agua destilada. El horno estaba a  $680^\circ\text{C}$  y usa aire de alta pureza para que no haya errores en la medida.

*Análisis microbiológico*

La caracterización microbiológica de la fracción acuosa de huevo se realizó por conteo de microorganismos aerófilos mesófilos totales. Este indicador microbiológico se empleó con el objetivo de estimar el estado higiénico del producto para su uso con fines alimentarios. Muestras de la fracción acuosa convenientemente diluidas se sembraron en placas de Nutrient agar (Biokar Diagnostics)

El conteo se realizó después de 72 horas de incubación a 30°C. Estos análisis se hicieron de la fracción acuosa en fresco, posteriormente de haber sido congelada y después de pasteurizar a 80 °C.

3.2 Proceso fermentativo.

3.2.1. Condiciones de cultivo.

La fracción acuosa obtenida tal y como se indicó en el apartado 3.1.1, se inoculó con la levadura 46 EDV<sup>®</sup>, nombre comercial para denominar a cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, (Lallemand Ethanol Technology). La cepa usada se ha aislado de melaza de remolacha azucarera y por lo tanto, se considera que está bien adaptada para la fermentación de sustratos ricos en azúcar. Su alto rendimiento la convierte en una excelente opción para la obtención de alcohol.

Siguiendo las indicaciones del fabricante, las levaduras en formato liofilizado fueron inoculadas directamente al medio de cultivo, sin necesidad de un preinóculo. La concentración de levaduras en el liofilizado es del orden de 10<sup>9</sup> ufc/g. Las cantidades de liofilizado inoculadas en los medios de cultivo fueron de 0,3 g/L, lo que supone una concentración inicial de levaduras de aproximadamente 3x10<sup>5</sup> ufc/mL

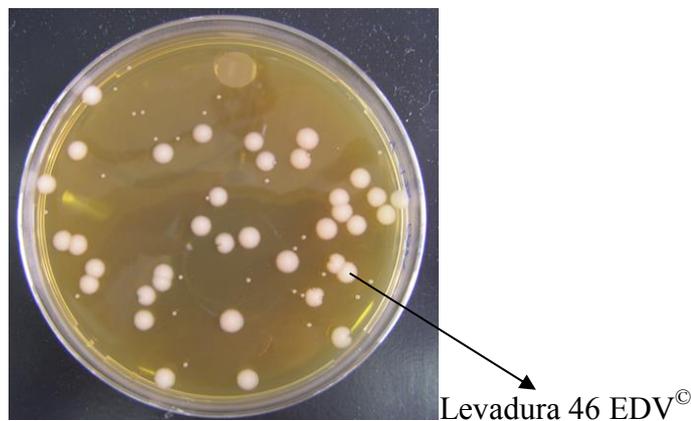


Figura 23. Observación en placa de colonias de levaduras

## MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de la fracción acuosa obtenida del fraccionamiento de la yema de huevo, explicada anteriormente, se separan fracciones de 100 mL cada una y se introducen en botes de vidrio de dicha capacidad y se procedió a realizar las fermentaciones, con o sin suplemento. Se realizaron cuatro fermentaciones distintas y cada una se llevó a cabo al menos por duplicado:

- Fracción acuosa sin ninguna suplementación.
- Fracción acuosa suplementada con 50 g/L de glucosa.
- Fracción acuosa suplementada con 100 g/L de glucosa.
- Fracción acuosa suplementada con 80 g/L de melaza.



Figura 24. Botes de vidrio donde se realizó la fermentación

En todos los casos se realizó una pasteurización previa para reducir la posible contaminación microbiana procedente del huevo. En el caso de la melaza, se suplementa con ella la fracción acuosa previamente a la pasteurización debido a la carga microbiana que puede aportar dicha melaza, en el resto de los casos se pasteurizo la fracción acuosa previamente a la adicción de glucosa.

La pasteurización se llevó a cabo introduciendo los botes de 100 mL que contenían el medio en un baño con agua a una temperatura de 80°C durante 4 minutos.

Una vez se ha enfriado el medio, se inoculó con la levadura. En el caso de la suplementación de glucosa se añade esta y se agita hasta su completa disolución.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Todas las fermentaciones fueron realizadas en un incubador Excella E24, (Incubador Shaker Series New Brunswick Scientific) a una temperatura de 30°C.

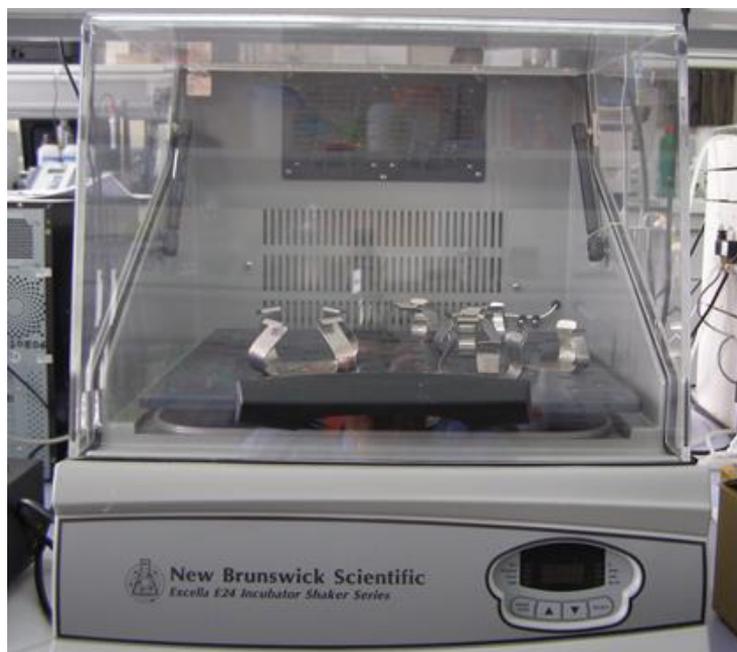


Figura 25. Incubador Excella E24, (Incubador Shaker Series New Brunswick Scientific)

### 3.2.2. Toma de muestras y análisis

La toma de muestras se realizó durante todo el proceso de fermentación, siendo el volumen total retirado inferior o igual al 20% del inicial. Se recogieron entre 4 o 6 mL de muestra por día, dependiendo del tipo de medio y de la concentración de azúcar en el mismo. Las muestras se emplearon de manera inmediata para los análisis microbiológicos y para el resto de análisis fueron sometidas a centrifugación durante 5 minutos a 10.000 rpm en una centrífuga High Speed Refrigerated Centrifuge 6500 (KUBOTA), para eliminar las células microbianas y se congelaron hasta el momento de ser analizadas. A continuación se detallan los análisis realizados.

#### *Analisis fisico-quimicos.*

- pH

El pH de las muestras se midió utilizando 2 mL de muestra, con un pH-metro Basic 20 (CRISON), realizando todas las medidas al menos por duplicado..

## MATERIAL Y MÉTODOS

### - Concentración de azúcares

La concentración de azúcares presentes en las muestras se evaluó por el método de Rebelein (Ya explicado en el apartado 3.1.2).

### - Concentración de etanol

Su análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases CLARUS 400 (PerkinElmer), acoplado a un detector de ionización de llama (FID), y la columna empleada para la separación fue una Meta.WAX TR-810532 (30 m x 0.25 mm x 0.5  $\mu$ m, Teknokroma).



Figura 26. Cromatógrafo de gases CLARUS 400 (PerkinElmer).

Tras la inyección de la muestra, según la temperatura a la que se opere y la afinidad de los componentes de la mezcla por cada fase, se consigue la separación de los mismos, que van llegando secuencialmente al detector, en el que generan al pasar una señal físico-química medible, que se traduce en un “pico” cuya área es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Las condiciones cromatográficas elegidas fueron las siguientes: inicialmente el horno se encuentra a 40°C, temperatura que se mantiene durante 2 minutos; seguidamente una rampa de temperatura de 30 °C/min hasta alcanzar los 100°C, y por último, una segunda rampa de temperatura de 45°C/min hasta los 200°C manteniéndose durante 4 min. La temperatura del inyector fue de 200°C y la del detector fue de 240°C. Se trabajó en modo split con una relación de división 1/85.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de la muestra se empleó 1-propanol (Sigma-Aldrich) como patrón interno (P.I.), sustancia que se añadió a todas las muestras y patrones en cantidad conocida (500 ppm).

Se realizó una curva de calibrado empleando una serie de disoluciones de etanol en agua, con una concentración comprendida entre 10 y 900 ppm de etanol. En la figura 25 se muestra la recta de calibrado obtenido con un coeficiente de correlación lineal de 0,9986.

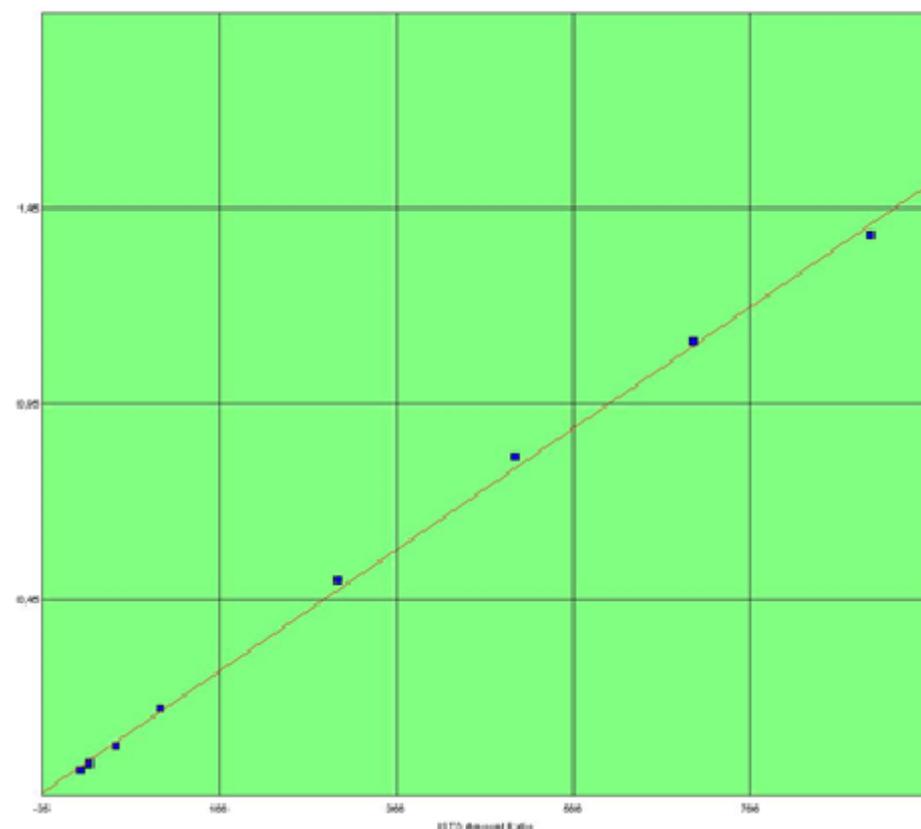


Figura 27. Recta de calibrado.

### - Ácidos orgánicos

La presencia de ácidos orgánicos en la muestra fue determinada mediante Cromatografía de Alta Eficacia (HPLC). Se han utilizado las siguientes condiciones analíticas 0,45 mM de  $H_2SO_4$  como fase móvil (pH~3,1), una temperatura de la columna fijada en 75°C y un flujo de 0,3 mL/min. Se ha empleado una columna ICsep ICE-ION-300 (Transgenomic), utilizando el índice de refracción como detector en un

## MATERIAL Y MÉTODOS

Cromatógrafo serie 1200 (Agilent Technologies). Las muestras fueron identificadas empleando standards externos de grado HPLC: lactosa (Sigma-Aldrich), ácido acético (Sigma-Aldrich), ácido cítrico (Sigma-Aldrich), glucosa (panreac), metanol (Sigma-Aldrich), etanol (Panreac), ácido fórmico (Sigma-Aldrich), ácido málico (Sigma-Aldrich). La adquisición y análisis de datos fue realizada con el software Agilent ChemStation. Siendo el equipo empleado el que se muestra en la figura:



Figura 28. Equipo de Cromatografía de Alta Eficacia.

### - Medición del color

El color de las muestras se determinará en el espacio de color CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), donde los tres parámetros representan la luminosidad de color ( $L^*$ ,  $L^*=0$  indica negro y  $L^*=100$  indica blanco), su posición entre rojo y verde ( $a^*$ , valores negativos indican verde, mientras valores positivos indican rojo) y su posición entre amarillo y azul ( $b^*$ , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

El equipo empleado es un espectrofotómetro UltraScan VIS (HunterLab) que se calibra utilizando como patrones una teja blanca y una trampa de luz y se comprueba su correcta calibración utilizando como referencia una teja verde. En la medición se emplea una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz (USVIS1034). Los análisis se realizan en reflectancia con el método de reflexión especular excluida, este método incluye los efectos de brillo y textura, de manera que la evaluación del color es más similar a la percepción del ojo humano.



Figura 29. Espectrofotómetro UltraScan VIS (HunterLab).

En nuestro caso las muestras antes de ser medidas fueron sonicadas para eliminar las burbujas de la fermentación, aproximadamente durante diez minutos. (Rosa M Alonso-Salces, 2004). Después se llenó la cubeta de vidrio con cada muestra y se realizaron diez mediciones de cada lado de la cubeta, para minimizar los errores.

- Cantidad de grasa

Para medir la grasa bruta en la muestra se usó el método gravimétrico sin hidrólisis previa, método habitualmente empleado para alimentos.



Figura 30. Extractor DET-GRAS.

Previamente al proceso de análisis de grasa, la muestra se sometió a un tratamiento previo con el fin de eliminar el agua de la misma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

-Filtrar 100mL de suspensión de tierra de diatomeas (10g/L) en el matraz kitosaco unido a la bomba de vacío.

- Se lavó con 1L de agua destilada.

- Y se filtró la muestra, previamente ajustada a pH 2 con HCl.

- Secar el cartucho (papel de filtro más la muestra que queda en él tras el filtrado) a 103°C durante dos horas y media.

Una vez realizado este tratamiento se procede a medir cada uno de los cartuchos y cada uno de los vasos metálicos del aparato. Posteriormente, se introduce en el equipo cada cartucho y los vasos. Se pone en modo Boiling (es decir, momento en el que se sumergen las muestras en éter dietílico), proceso que dura unos 40 minutos. Una vez finalizado se cambia a modo Rising otros 40 minutos y por último en modo evaporación durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se pueden pesar de nuevo los vasos donde estará depositada la grasa.

Cálculos de la cantidad de grasa en gramos:

$$\text{gramos de grasa} = (W2 - W0) / W1$$

Siendo:

W2= peso del vaso después del proceso

W1= peso del cartucho

W0= peso del vaso antes de introducirlo en el equipo

### *Análisis microbiológicos.*

- Recuento de microorganismos

Se realizó un recuento de colonias utilizando el método estándar de recuento en placa. Para ello se hicieron sucesivas diluciones por triplicado, y se sembraron en medio YPD, adecuado para levaduras (compuesto por 1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa y 2% de agar). Una vez preparados los medios, la siembra se realizó por siembra en masa y posteriormente las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas. Una vez transcurrido el tiempo necesario se realizó el conteo de las placas, y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente, obteniendo así el número de ufc/mL.

- Microscopio óptico

Para determinar la morfología y tipo de colonias que aparecen en las fermentaciones se realizaron al microscopio óptico una serie de fotografías. Se empleó un microscopio

## MATERIAL Y MÉTODOS

óptico automatizado con platina motorizada Prior. (Microscopio Olympus BX61). Las observaciones se realizaron en fresco, tomando directamente una muestra del medio y tras una tinción Gram, técnica diferencial comúnmente empleada en el diagnóstico microbiológico. Los reactivos empleados en la tinción de Gram fueron cristal violeta (colorante básico), lugol (mordiente), alcohol-cetona (decolorante) y safranina (colorante de contraste).

El cristal violeta sirve como colorante básico uniéndose a la pared celular bacteriana, con ayuda del mordiente (lugol) que refuerza la unión del colorante. Las bacterias Gram positivas, debido a la estructura y composición bioquímica de su pared celular retienen el complejo cristal violeta-lugol y aun después del tratamiento con el decolorante conserva el colorante básico, por lo que se observan de color púrpura violeta en el microscopio. Las bacterias Gram negativas pierden el colorante básico cuando son tratadas con el decolorante debido a que el alcohol disuelve el contenido lipídico de la pared celular lo que aumenta la permeabilidad celular, dando como resultado la pérdida del complejo cristal violeta-lugol. Las bacterias decoloradas captan entonces el colorante de contraste, razón por la cual estas bacterias se observan de color rojo al microscopio.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de la fracción residual

#### 4.1.1. Análisis físico químicos

Con el fin de determinar la adecuación de esta fracción como sustrato del proceso fermentativo, se analizó su pH, su contenido en carbono (azúcares, COT), nutrientes (N, P y S). En la caracterización físico-química de la fracción acuosa de la yema de huevo se encontraron los valores mostrados en la tabla 9:

Tabla 9. Valores de la caracterización de la fracción acuosa.

Ph	6,7-7
Azúcar (g/L)	1-3
Carbono total orgánico (g/L)	7,5
Nitrógeno (g/L)	383
Azufre (mg/L)	0,3
Fósforo (mg/L)	0,6

El pH óptimo para el desarrollo de estas levaduras es de entre 4 y 5, sin embargo tiene una amplia tolerancia lo que le permite desarrollarse en medios inicialmente neutros como es el caso. Comparando esta tabla con los datos del apartado 2.3 correspondiente a los requerimientos nutricionales de *Sacharomyces*, se puede ver que las concentraciones de nitrógeno, azufre y fósforo necesarias para el crecimiento son de 70 g/L, 0,24 g/L y 0,23 g/L respectivamente (Colombié, et al, 2006, Genisheva, et al, 2013), por lo que el medio aporta suficiente cantidad de estos nutrientes. Cuenta sin embargo con un bajo contenido en carbono que solo permitiría llegar a una concentración teórica de alcohol del 1% (v/v).

#### 4.1.2. Microbiología y pasteurización.

En el medio de cultivo, sin haber sido inoculado con las levaduras, se observó crecimiento de diferentes tipos de colonias en las placas Nutrient agar (Biokar diagnostics) incubadas 48 horas, probablemente procedentes del propio huevo y de su manipulación durante el proceso de fraccionamiento.

La yema de huevo es estéril, pero debido al número de microorganismos existentes en la cáscara, la yema se contamina. El número de microorganismos presentes en la cáscara puede variar de algunos cientos a decenas de millones, con una media de 105ufc/mg.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta contaminación depende muy estrechamente de las condiciones de higiene durante la producción y en nuestro caso por la posterior manipulación.

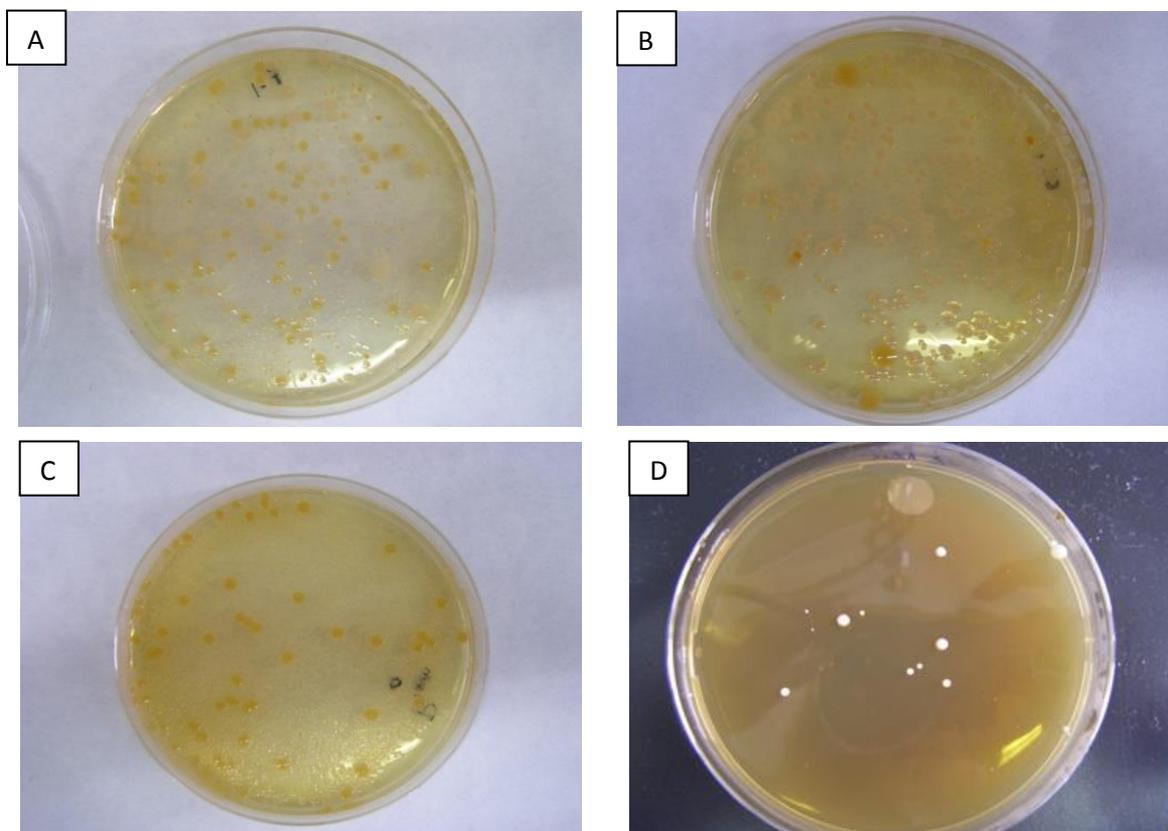


Figura 31. A. medio fresco B. medio congelado C. medio pasteurizado 1 minuto D. medio pasterurizado 4 minutos.

En primer lugar se analizaran muestras de la fracción acuosa procedentes del proceso de fraccionamiento tanto en fresco como después de la congelación. No se apreció diferencia significativa en el recuento total, del orden de  $10^5$  ufc/mL (Emiro, 2003) en ambos casos. En las diferentes placas se observan cuatro tipos de colonias: blancas, mucosas, naranjas claras y naranjas oscuras. (se pueden ver en la figura 31 tras los diferentes tratamientos térmicos).

Los recuentos de dichas placas mostrados en la tabla 10 demuestran que es necesario tratamiento térmico para hacer disminuir los microorganismos presentes en la fermentación, como paso previo al proceso fermentativo. Según lo explicado en la Norma Covenin (Emiro, 2003) el máximo de aerobios mesófilos permitidos en alimentos es de  $2 \times 10^4$  ufc/mL, la fracción acuosa tiene del orden de  $10^5$ , con lo que supera a lo permitido por esta norma. Debido a esto se ensayaron distintos tratamientos térmicos de pasteurización para que disminuyera el número de dichos microorganismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se probó así a pasteurizar la muestra a 80°C, entre 1 y 4 minutos. En las pasteurizaciones realizadas durante 1, 2 y 3 minutos, se logró reducir dos órdenes de magnitud, no apreciándose diferencia importante. En el caso de 4 minutos se consiguió reducir al orden de  $10^2$  ufc/mL. En todos los casos estaría por debajo del contenido microbiológico establecido como máximo en la citada norma, sin embargo, finalmente se decide realizar la pasteurización durante 4 minutos para estar en un margen de seguridad.

Tabla 10. Valores de UFC/mL en la fracción acuosa

Fresco	$1,2 \times 10^5$
Congelado	$3,1 \times 10^5$
Pasteurizado 1 minuto	$5,4 \times 10^3$
Pasteurizado 2 minutos	$5,3 \times 10^3$
Pasteurizado 3 minutos	$3,0 \times 10^3$
Pasteurizado 4 minutos	$3,8 \times 10^2$

### 4.2. Proceso fermentativo.

#### 4.2.1. Evolución de parámetros físico químicos.

1) *pH*: Como se puede observar en la figura 32, en todos los experimentos en los que se emplea como medio la fracción acuosa sin suplementar el pH inicial toma valores cercanos a 7 produciéndose un descenso durante las primeras 24 horas de la fermentación, para luego alcanzar un valor de pH próximo a 5. Una vez caracterizada la fracción acuosa y tras haber llegado a la conclusión de que el único nutriente que se requiere añadir es el carbono con el fin de obtener una bebida con mayor contenido alcohólico, se procedió a realizar las fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*. Se hicieron cuatro tipos de fermentaciones: sin adicionar nada y adicionando 50 g/L de glucosa, 100 g/L de glucosa y 80 g/L de melaza (equivale a 50 g/L de azúcares). A continuación se comentan los resultados obtenidos.

Este descenso inicial del pH se deriva del propio metabolismo de las levaduras, ya que como productos de la fermentación alcohólica, además del etanol y del CO<sub>2</sub>, se obtienen ácidos orgánicos. Al tratarse de medios acuosos, parte del CO<sub>2</sub> obtenido durante la fermentación se disuelve en el agua, formando ácido carbónico, que junto con los ácidos orgánicos formados contribuye a la acidificación del medio.

El pH final de la mayor parte de las bebidas fermentadas esta entre 3 y 4. En esta fermentación no se llegó a valores tan bajos debido a la pequeña concentración de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

azúcares del medio, lo que hizo que el proceso fermentativo tuviera lugar en muy poca extensión.

El valor de pH inicial de los medios de cultivo formados por la fracción acuosa suplementada con glucosa o melaza osciló entre valores de 6 a 7 (ver figuras A, B, C y D).

Al igual que en el medio constituido por la fracción acuosa sin suplementar, se pudo observar un descenso inicial del valor de pH, explicable también por la formación de ácidos orgánicos y  $\text{CO}_2$  continua descendiendo durante las 50 primeras horas para luego estabilizarse entre 3,9 y 4,5 valor inferior a los valores del medio sin suplementación, pero muy similar a los obtenidos en otras fermentaciones alcohólicas (Suárez, 2006). No se observó diferencia en cuanto a suplementada con glucosa o melaza en términos de evolución del pH.

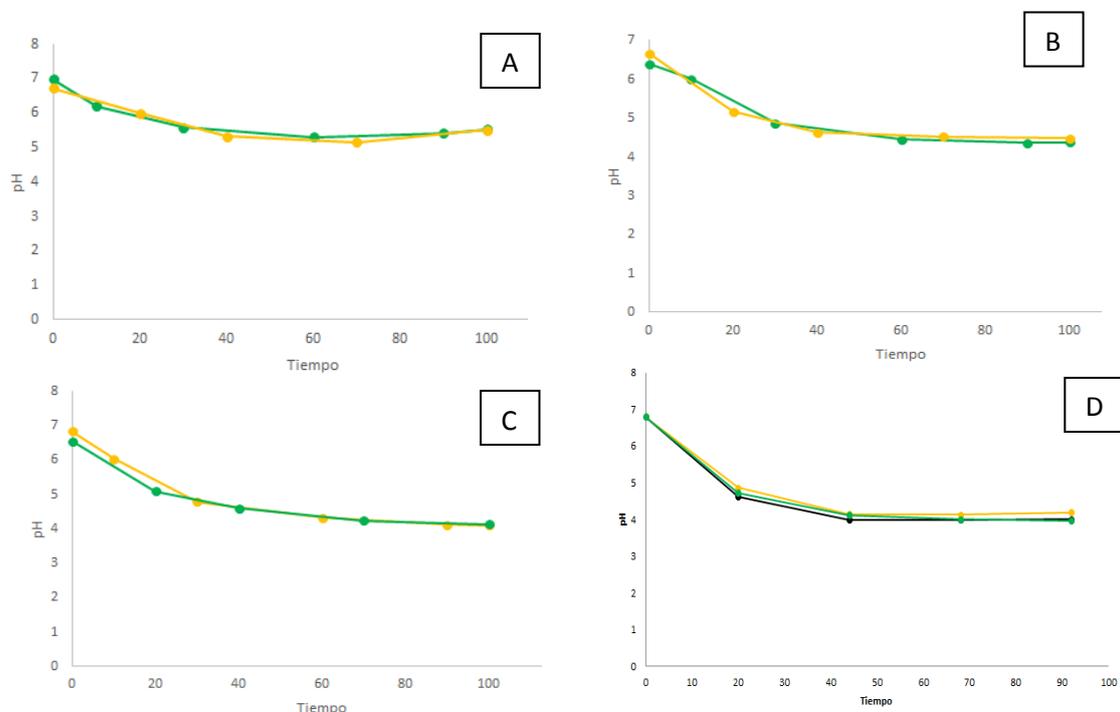


Figura 32. Evolución del pH durante las fermentaciones con: A. Medio sin suplementar B. Medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. Medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. Medio suplementado con melaza.

2) *Azúcares*. Los azúcares constituyen la principal fuente de carbono empleada por los microorganismos. En la fracción acuosa de la yema de huevo existen pero a muy bajas concentraciones. Estos azúcares son utilizados por las levaduras dando lugar a etanol  $\text{CO}_2$  y biomasa como principales productos, lo que provoca que su concentración disminuya en el medio a medida que la fermentación avanza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

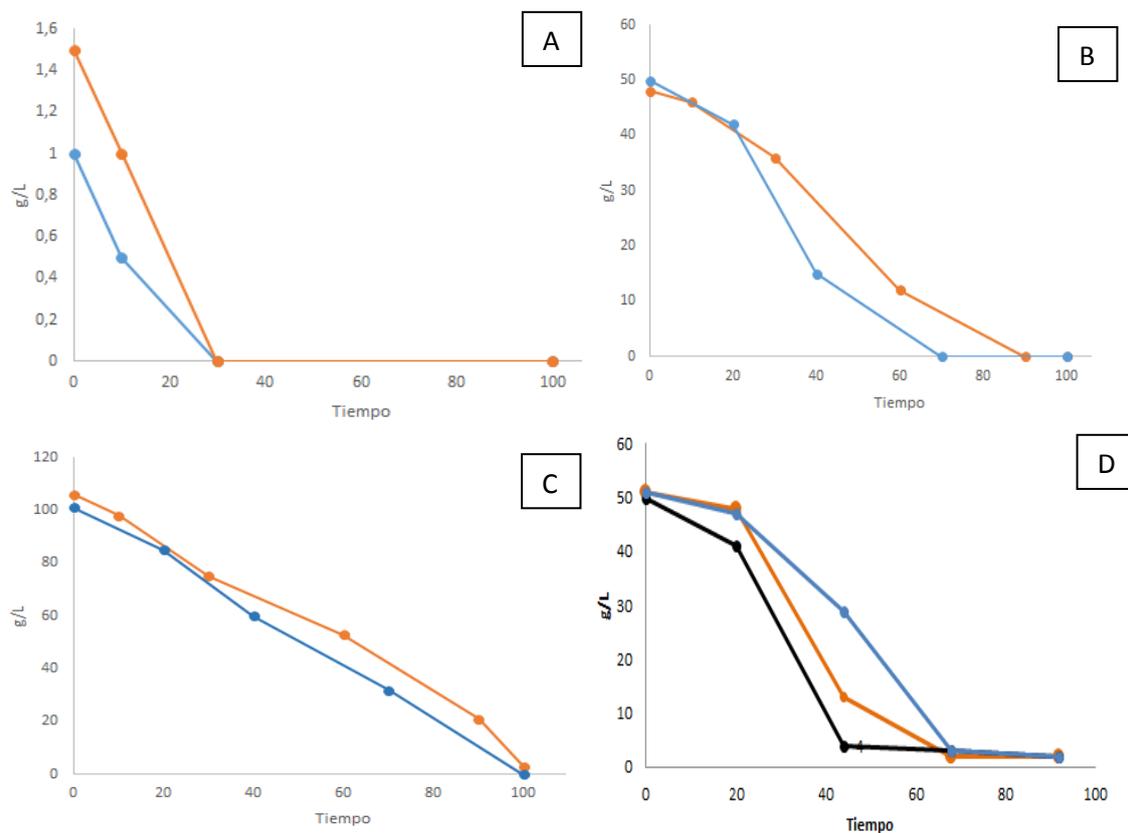


Figura 33. Evolución de la concentración de azúcar durante las fermentaciones con: A. El medio sin suplementar B. El medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. El medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. El medio suplementado con melaza.

La concentración de azúcares iniciales en la fracción acuosa sin suplementar era relativamente baja, con un contenido inicial, que dependiendo de la partida de huevos y del proceso de separación variaba entre 1 y 3 g/L.

Las fracciones que se utilizaron en las fermentaciones tenían un contenido en azúcares de 1 y 1,5 g/L. En ambos casos la concentración de los azúcares en el medio de fermentación se redujo hasta prácticamente agotarse en menos de 30 horas.

Podríamos decir que el rendimiento de consumo de azúcares fue alto, ya que el 100% del azúcar presente en el medio se empleó en la fermentación.

En este caso, el valor inicial de la concentración de azúcares oscila entre 48 y 50 g/L, dependiendo de la composición del medio. Cabe recordar que en esta serie de experimentos se realizó un enriquecimiento del medio con 50 g/L de glucosa.

Cuando el medio se suplementó con glucosa, en ambos casos se observó una disminución de la concentración de azúcares de forma constante hasta llegar

prácticamente a cero, no observándose en ningún caso la existencia de azúcares residuales.

Se pueden observar pequeñas diferencias entre las concentraciones de azúcares de algunos de los duplicados, atribuibles, al igual que las diferencias en el recuento de microorganismos, a las diferentes partidas de huevos empleadas, que puede generar ligeras diferencias en el contenido de azúcares de los duplicados.

En el caso del medio suplementado con melaza, la evolución de la concentración de azúcar se puede observar en la figura 33 C. Se partió de una concentración de azúcar de 50 g/L que va disminuyendo a lo largo del proceso. El comportamiento fue similar en las triplicadas quedando 2 g/L como azúcar residual, si bien en un caso fueron necesarias 44 horas y en los otros dos 68 horas. A diferencia de las otras fermentaciones anteriores en este caso quedarían azúcares residuales, lo que podría ser debido a que la melaza contiene azúcares no fermentables que sin embargo son reductores del cobre, con lo que se detectan en los análisis por Rebelein (Ferrer, et al, 2004).

Tabla 11. Rendimientos del consumo de azúcares.

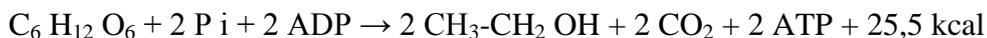
	Azúcares iniciales (g/L)	Azúcares residuales (g/L)	Azúcares residuales (%)	Azúcares consumidos (g/L)	Rendimiento (azúcares consumidos / azúcares totales)	Velocidad consumo de azúcares (g/L*h)
Medio sin suplementar	1,2	0	0%	1,2	100%	0,04
Medio con 50 g/L de glucosa	49	0	0%	49	100%	0,70
Medio con 100 g/L de glucosa	103	0	0%	103	100%	1,03
Medio con melaza	50	2	4	48	96%	0,8

En cuanto a la velocidad media de consumo de azúcares (Tabla 11) fue similar en los dos casos que se partía de 50 g/L, independientemente de que el suplemento fuera melaza o glucosa. Cuando se partió de 100 g/L, la velocidad de consumo fue superior motivado por una mayor concentración de sustrato disponible. La única diferencia apreciable entre utilizar glucosa y sustrato es que mientras que con la glucosa el consumo se produjo desde el momento inicial a una velocidad más o menos constante, con la melaza se puede distinguir una etapa inicial de aproximadamente 20 horas donde el consumo fue más lento, indicando la necesidad de aclimatación de los microorganismos al nuevo sustrato.

3) *Etanol*: En la fermentación alcohólica se utilizan como sustrato los hidratos de carbono (principalmente azúcares como la glucosa o fructosa) presentes en el medio para transformarlos en etanol, dióxido de carbono y energía en forma de ATP. Por tanto,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la disminución de la concentración de azúcares comentada en el apartado anterior, hace suponer un incremento de la concentración de etanol paralelo a ella. La producción de etanol se lleva a cabo a través de la vía glucolítica, que en su forma más simple, se puede expresar de la siguiente forma:



A partir de esta ecuación se deduce que por cada mol de glucosa consumido se producen dos moles de etanol. Sin embargo, este rendimiento es solamente teórico, ya que no toda la glucosa consumida es convertida en etanol, sino que un porcentaje será utilizado para la síntesis de las estructuras celulares y mantenimiento de la célula. Bajo condiciones ideales el rendimiento conseguido puede ser del 90-95%.

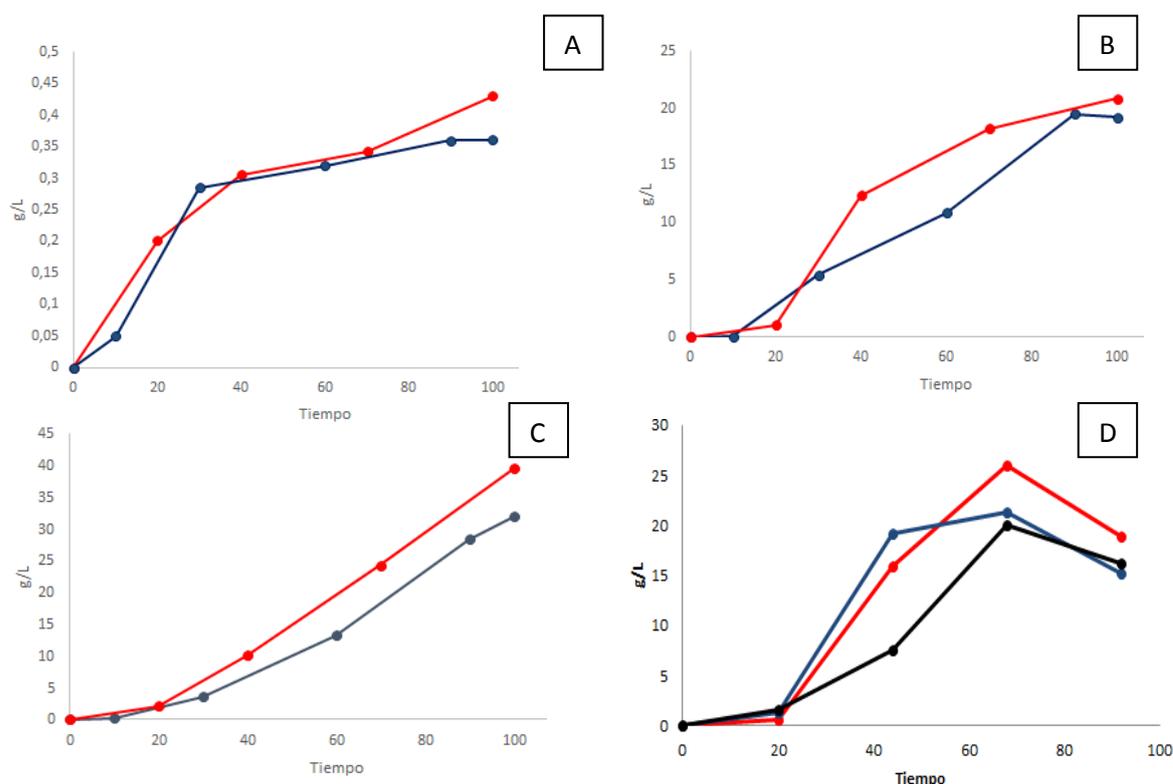


Figura 34. Evolución de la concentración de etanol durante las fermentaciones con: A. El medio sin suplementar B. El medio suplementado con 50 g/L de glucosa C. El medio suplementado con 100 g/L de glucosa D. El medio suplementado con melaza.

En todos los casos la concentración inicial de etanol en el medio de partida era 0 g/L. La evolución de la concentración de etanol en el medio sin suplementación puede verse resumida en la figura 34.

La concentración de etanol en medio sin suplementar fue aumentando con el tiempo de fermentación, alcanzando entre las 90 y 100 horas, un valor máximo de 0,4 g/L, punto en el que se estabiliza. Teniendo en cuenta la densidad del etanol (789 g/L) se puede calcular la graduación alcohólica del producto final: 0,05% (v/v) de etanol.

Por cada mol de glucosa se producen dos moles de etanol, con lo que la producción teórica de etanol, sería de 0,5 gramos de etanol producido por gramo de glucosa consumido. Teniendo en cuenta el azúcar consumido y la densidad del etanol se puede calcular la concentración teórica en 0,08% (v/v) de etanol. Teniendo en cuenta el valor real y el teórico, la fermentación de la fase acuosa sin suplementar tiene un rendimiento del 67%. Considerando el bajo contenido en azúcar y el bajo rendimiento obtenido, se ha optado suplementar el medio con azúcar con el fin de obtener una graduación un poco superior.

La evolución de la concentración de etanol en el medio durante las fermentaciones suplementadas con glucosa (50 y 100 g/L) se puede ver en la figura 34 (B y C). En todos los experimentos con el medio suplementado con 50 g/L de glucosa, la concentración de etanol fue aumentando con el tiempo de fermentación, alcanzando entre las 90 y 100 horas, un valor máximo de entre 19 y 21 g/L, punto en el que se estabiliza. Este valor equivale a 2,5% (v/v) de etanol. Esta graduación es similar a la que presentan bebidas fermentadas como algunas cervezas de baja graduación (Suarez, 2006).

Considerando el azúcar consumido la concentración teórica de etanol sería 25 g/L. Conociendo el valor real y el teórico, la fermentación de la fase acuosa suplementada con 50g/L de azúcar tiene un rendimiento del 80%. La concentración de etanol en el medio suplementado en 100 g/L de glucosa fue aumentando con el tiempo de fermentación, alcanzando a las 100 horas, un valor máximo de entre 32 y 39 g/L que se corresponde con 4,1 y 4,9% (v/v), valor similar a cervezas y sidra (Suarez, 2006). Teniendo en cuenta el azúcar consumido la cantidad de etanol teórica sería 52, lo que daría un rendimiento medio del 68%. Teniendo en cuenta que el rendimiento de producción de etanol fue menor en este caso y que no se pretendía obtener una bebida con alto grado alcohólico, se seleccionó la concentración inicial de azúcares de 50 g/L como adecuada.

Así, se decidió probar a suplementar con una fuente residual de azúcar como es la melaza, en una cantidad equivalente a una concentración inicial de azúcares de 50 g/L. La concentración de etanol evolucionó según se muestra en la figura 34 D. La concentración de etanol fue aumentando con el tiempo de fermentación, alcanzando valores máximos de 20 y 25 g/L a las 70 horas. Esto equivale a 2,5 y 3,3% (v/v). La concentración teórica sería de 24,5g/L. Conociendo el valor real y el teórico, la fermentación de la fase acuosa suplementada con melaza tiene un rendimiento del 91 %. En este caso se observó que si se deja continuar la fermentación, la concentración de etanol se reduce. El momento en que se alcanza el máximo coincidió con el momento en que cesó el consumo de azúcares, con lo que es probable que se deba al metabolismo diáuxico de las levaduras y en ausencia de azúcares fermentables utiliza el etanol como fuente de carbono (Sánchez, 2014).

Tabla 12. Rendimientos del etanol para los diferentes medios.

	Etanol real (g/L)	Etanol teórico (g/L)	Rendimiento (%)
Sin suplementar	0,4	0,6	67
Suplementado con 50g/L de glucosa	20	25	80
Suplementado con 100g/L de glucosa	35,5	52	68
Suplementado con melaza	22,5	24,5	91

En cuanto al rendimiento de etanol en los diferentes medios (Tabla 12), el medio sin suplementar tubo un rendimiento considerablemente más bajo que el medio suplementado con 50 g/L de glucosa y el suplementado con melaza, que proporcionó el rendimientos más alto de todos.

#### 4.2.3 Microbiología:

Tras la inoculación con levaduras en los diferentes medios de cultivo se hicieron recuentos en placas de microorganismos para observar el crecimiento de las levaduras durante la fermentación, así como el de la microbiota autóctona, ya que los medios no fueron esterilizados. Debido a la presencia de grasa en la fracción acuosa, este recuento fue hecho con dificultad ya que las levaduras formaban flóculos y en las siembras cubrían todas las placas. Por ello se realizaron observaciones al microscopio óptico, de los medios en fresco, para observar la presencia de dichos flóculos y tinciones Gram de algunas colonias, determinando así de que microorganismos se trataba.

El recuento de microorganismos se hizo una vez cada 24h, durante 100h, obteniéndose los resultados que vemos en las siguientes gráficas:

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

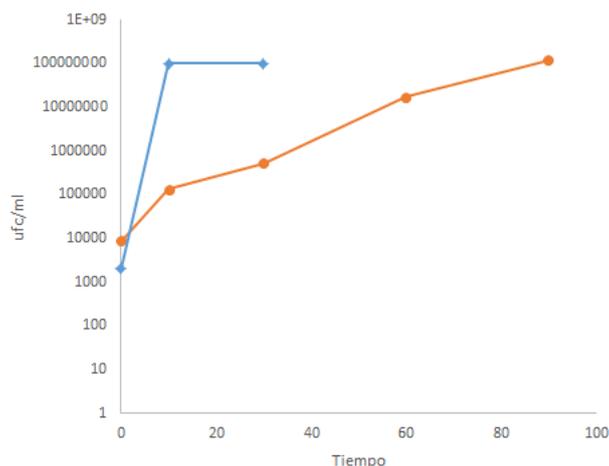


Figura 35. Evolución del recuento de levaduras, línea naranja medio sin suplementar, línea azul medio suplementado con glucosa.

En el caso de las levaduras que fueron inoculadas, tanto para el medio sin suplementación como los suplementados con glucosa, podemos observar que sufrieron un incremento desde entre  $10^3$ - $10^4$  ufc/mL hasta  $10^8$  ufc/mL (Figura 34).

A pesar de haber inoculado el medio con la cantidad de levadura recomendada por el fabricante, se partió de una concentración ligeramente baja, ya que se recomienda una concentración inicial de  $10^5$  ufc/mL, probablemente al tratarse de levaduras liofilizadas necesiten cierto periodo de tiempo para comenzar su crecimiento. En cualquier caso, en el primer día se alcanzaron los niveles recomendados.

Si hablamos de los microorganismos propios del medio, podríamos destacar dos tipos de colonias que aparecían en todas las placas junto con las levaduras. Se trata de colonias de pequeño tamaño y color blanco y otras colonias de tamaño medio de aspecto mucoso y blanco (Figura 36)

En el caso de las colonias pequeñas blancas, como se muestra en las gráficas, tanto en los medios sin suplementar como en los suplementados con azúcar se observa un incremento de  $10^4$  ufc/mL a  $10^7$  ufc/mL. Y en los medios suplementados con melaza hay un crecimiento de hasta  $10^{10}$  ufc/mL, según esta diferencia, podríamos interpretar que la melaza proporciona un medio más rico para el crecimiento de este tipo de microorganismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

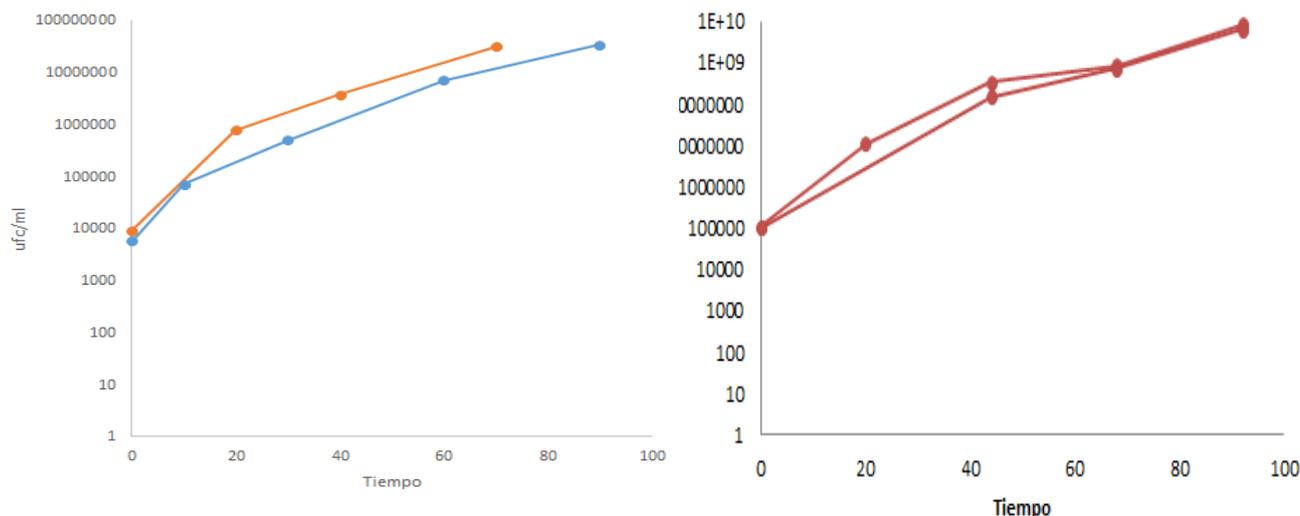


Figura 36. Evolución recuento de colonias blancas pequeñas, línea naranja medio sin suplementar, línea azul medio suplementado con glucosa. B. Recuento de colonias blancas pequeñas en el medio suplementado con melaza (duplicados).

Por otro lado, en la figura 37 se muestra el crecimiento de las colonias de aspecto mucoso. Dichas colonias tienen un crecimiento de  $10^6$  ufc/mL hasta  $10^7$  ufc/mL en el medio sin suplementación, sin embargo en los medios suplementados su crecimiento se ha visto incrementado hasta  $10^{11}$  ufc/mL. De lo que se deduce que este tipo de colonias necesitan mayor cantidad de azúcar para crecer que la que contiene el medio sin suplementar.

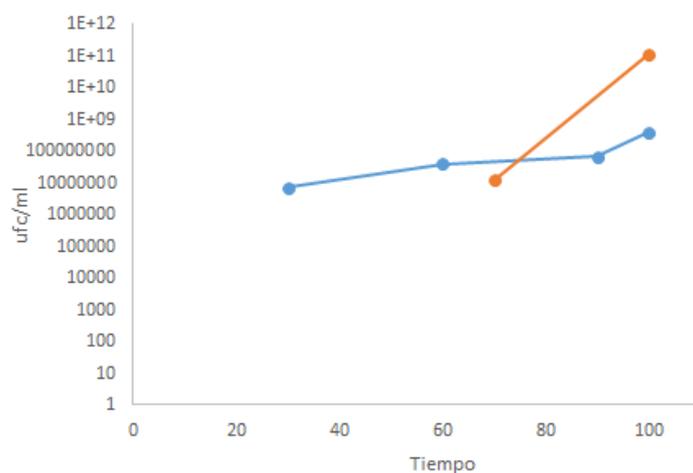


Figura 37. Recuento de colonias mucosas. Línea naranja medio sin suplementar y línea azul medio suplementado con glucosa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de tratar de determinar el tipo de microorganismos presentes en el medio, se realizaron observaciones al microscopio óptico, en la figura 38 se muestran fotos tomadas del medio de cultivo sin suplementar y suplementado con glucosa a tiempos cero. En ellas se observan los flóculos formados por las levaduras (Figura 38 A) También aparecen algunas levaduras del genero *Saccharomyces* formando cadenas y además otras levaduras de gran tamaño probablemente del genero *Torula*, ya que son levaduras que pueden aparecer en el huevo cuya morfología se asemeja a la observada (Caso, 2014) (Figura 38 B) y también pequeños cocos.

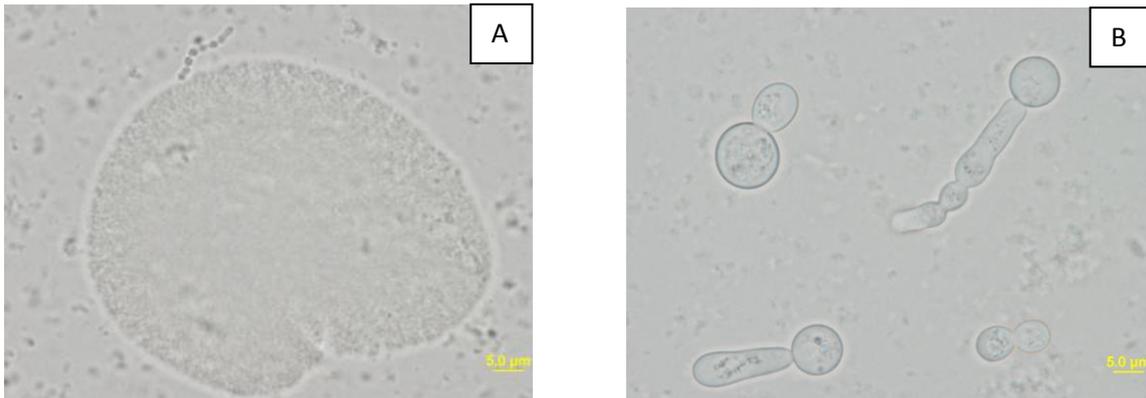


Figura 38. Observación en fresco del medio suplementado con azúcar. A. Flóculos y cadenas de levaduras B. Levaduras del género *Torula*.

También se observó en fresco el medio suplementado con melaza, por si había cambios en cuanto a los microorganismos presentes pero los resultados fueron similares que en el caso anterior, como se muestra en la figura 39:

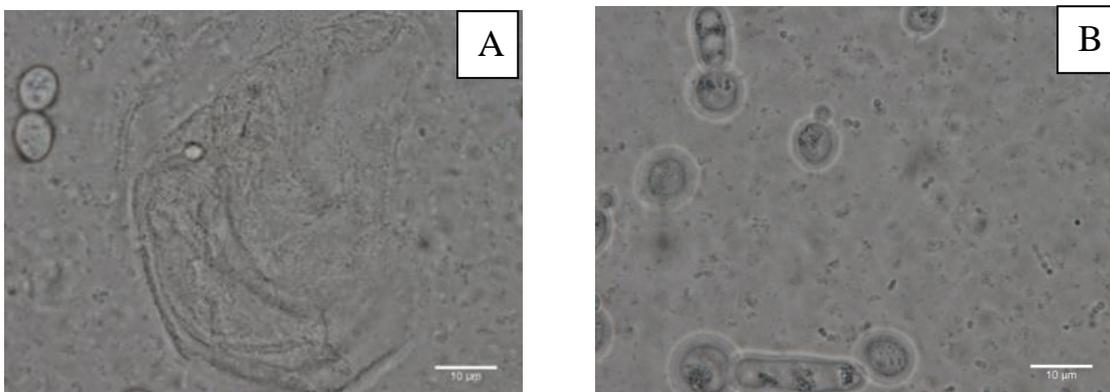


Figura 39. Observación en fresco del medio suplementado con melaza. A. Flóculos B. Levaduras del género *Torula* y cadenas de levaduras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la gran variedad de colonias que aparecían en las placas se hicieron tinciones Gram a algunas de las colonias para determinar de qué clase de microorganismos se trataba. Se trata de observar lo representado en las figuras 40, 41 y 42.

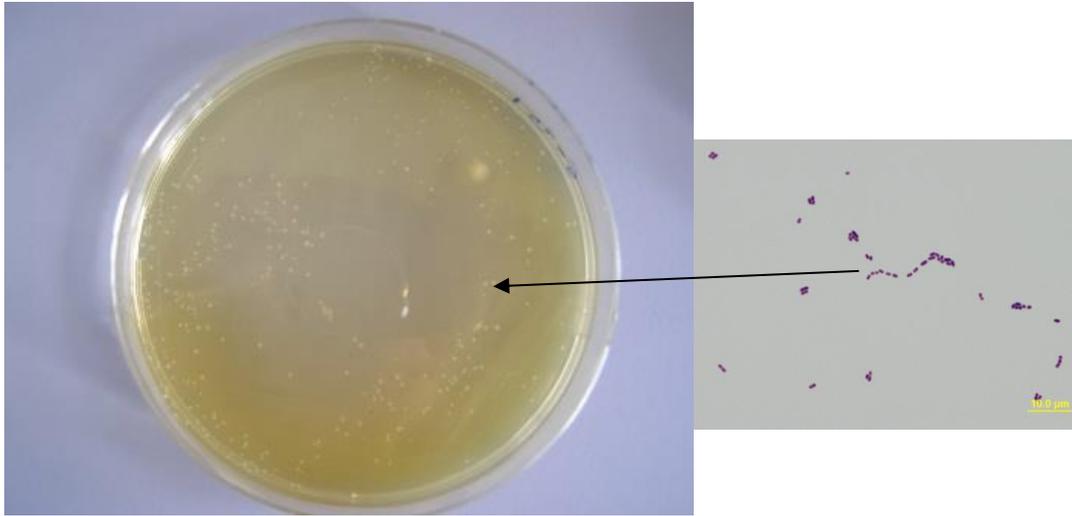


Figura 40. Observación en placa de colonias blancas pequeñas (Izquierda) y su vista al microscopio con tinción Gram (Derecha).

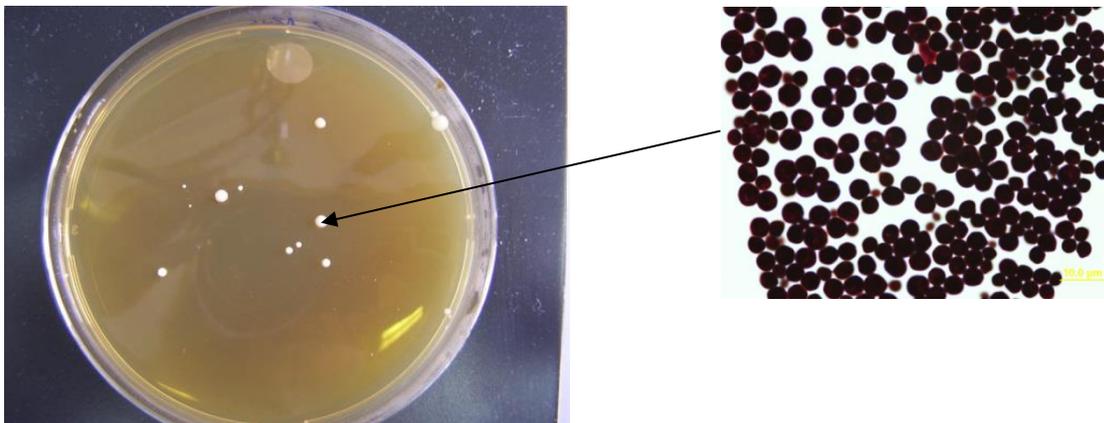


Figura 41. Observación en placa de colonias blancas más grandes (Izquierda) y su vista al microscopio con tinción Gram (Derecha).

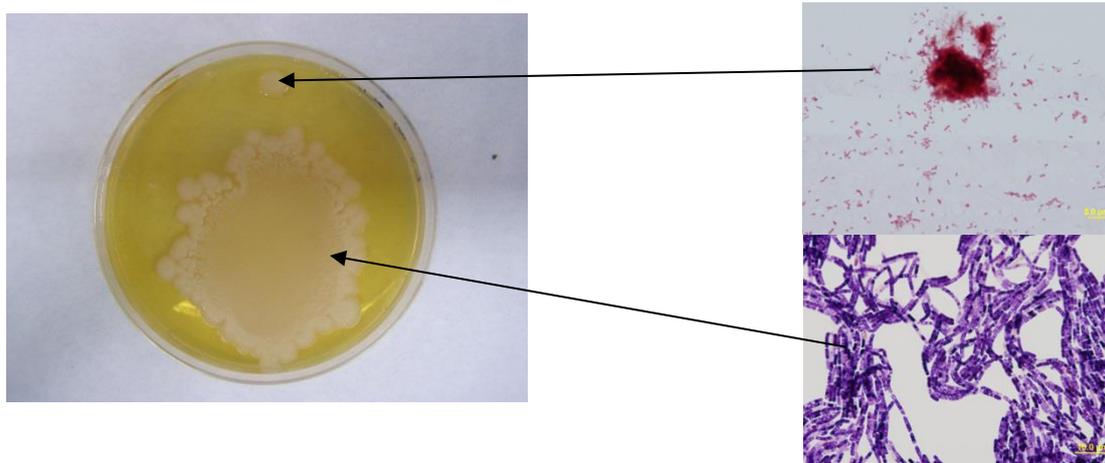


Figura 42. Observación en placa de colonias mucosas y masa de levaduras (Izquierda) y su vista al microscopio, arriba a la derecha las colonias mucosas y abajo a la derecha las levaduras.

Tomando muestra de una de las colonias blancas pequeñas que aparecen en la figura 40 se pueden observar que se trata de cocos Gram positivos. Según se ven en las placas de la figura 41 las colonias blancas de mayor tamaño podrían tratarse de las levaduras del género *Torula*, antes mencionadas por su apariencia similar a las observadas en la literatura. Por último en la placa de la figura 42, se ve que las colonias mucosas se deberían verse a cocos Gram negativos que dejan un rastro de mucopolisacáridos, de ahí su aspecto mucoso. También aparece en esta figura una masa blanca que vista con tinción Gram nos aclara que se trata de las levaduras inoculadas (mismo aspecto que el observado con las levaduras empleadas para inocular).

#### 4.2.4 Características del producto final

Al final de las fermentaciones suplementadas con glucosa se obtuvo un producto de color amarillo anaranjado, con un buen aroma, una graduación entre 2,5 y 3,3% (v/v) y conteniendo CO<sub>2</sub> en disolución. En el caso del suplementado de melaza el color del producto era más tostado, también con buen aroma, con un contenido en etanol entre 2,5 y 3,3% (v/v) y 2 g/L de azúcares residuales. A diferencia de estos resultados, en los casos en que se realizó la fermentación sin suplementar el producto presentaba un olor desagradable y se observó la separación en dos fases, una fase acuosa y otra grasa (figura 43)

### 1) Determinación del contenido en de grasa

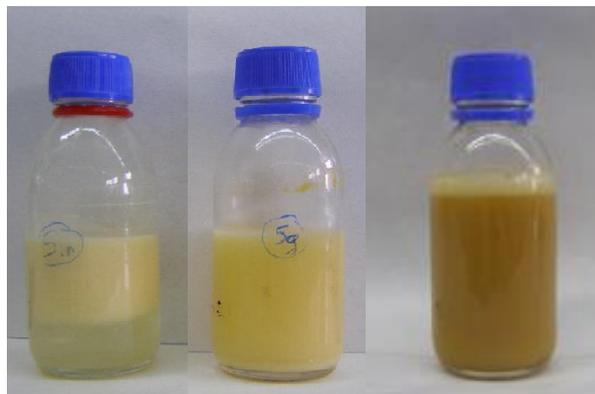


Figura 43. Botes con sustrato durante las fermentaciones

A la vista de que en la fermentación sin suplementación aparecía una capa superior de grasa, mientras, que en las dos suplementadas con glucosa y melaza esta capa era mucho más estrecha, se midió el contenido en grasa de las dos capas observadas con el fin de determinar si el contenido total de grasa era distinto o simplemente se debía lo observado a una distinta distribución. Hay que recordar que en el medio sin suplementación la cantidad de  $\text{CO}_2$  librado fue muy bajo, con lo que no hay mezcla continua del medio ya que el azúcar inicial se consume en las primeras 30 horas. Por el contrario en los medios suplementados si hay aparición de burbujas formadas por el  $\text{CO}_2$  generado durante la fermentación, proporcionando una buena mezcla al producto.

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 13. Los datos muestran que en la fermentación del medio sin suplementación la capa superior una concentración de grasa diez veces que el medio con suplementación de glucosa. Por otra entre la capa inferior del medio hay gran diferencia con la capa superior, en los dos casos y el contenido de grasa en la capa inferior del medio suplementado fue aproximadamente de la mitad que en el medio sin suplementar. Se concluye entonces que las diferencias visuales observadas se deben tanto a una mayor mezcla en los medios suplementados como a un menor contenido en grasa. Esta diferencia en el contenido en grasa puede deberse a que las partidas del medio son distintas, y a que es posible que parte de los lípidos hayan sido consumidos durante el proceso fermentativo.

Tabla 13. Concentraciones de grasa en las diferentes capas del sustrato en las fermentaciones.

Sin suplementación	Capa superior	32 g/L
	Capa inferior	1.5 g/L
Con glucosa	Capa superior	3.2 g/L
	Capa inferior	0,6 g/L

2) Color:

Se hicieron medidas de color en los distintos medios antes y después de la fermentación cuyos resultados se muestran en la tabla 14. También se midió el color, una vez filtrados los productos en una bomba de vacío. En la figura 44 se ven los valores de los productos filtrados comparados con dos productos comerciales (zumo de fruto con leche y bebida de café).

Tabla 14. Medidas de color en los distintos medios antes y después de la fermentación y filtrados.

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Fracción sin suplementar antes de la fermentación	63,1±0,1	2,5±0,06	21,6±0,1
Fracción con melaza antes de la fermentación	39,4±0,1	5,5±0,05	21,5±0,2
Producto fermentado sin suplementar	70,5±0,1	3,2±0,02	24,6±0,1
Producto fermentado suplementado con 50g/L	61,6±0,07	1,5±0,06	18,02±0,2
Producto fermentado suplementado con 100g/L	62,4±0,1	1,2±0,07	17,06±0,1
Producto fermentado suplementado con melaza	50,4±0,08	8,8 ±0,07	32,7±0,4
Producto fermentado suplementado con 50g/L (filtrada)	40,2±0,06	-2,41±0,01	-2,7±0,04
Producto fermentado suplementado con 100g/L (filtrada)	60,1±0,1	-1,3±0,06	10,9±0,10
Producto fermentado suplementado con melaza (filtrada)	47,5±6,9	6,9±0,09	28,25±0,04

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores  $L^*$  indica de 0 a 100, de negro a blanco. La fracción con melaza sin fermentar se asemeja a la bebida con café teniendo ambas un valor de 39 siendo las dos bebidas oscuras. Al final de la fermentación este valor subió a 50, lo que indica que aclara durante el proceso. Este valor es muy similar al que presenta una bebida comercial de zumo de fruta con leche (ver figura 44) Si se comparan los valores del medio inicial de yema con los valores finales de las fermentaciones suplementadas con glucosas se observan valores cercanos entre todas ellas, alrededor de 61 a 63.

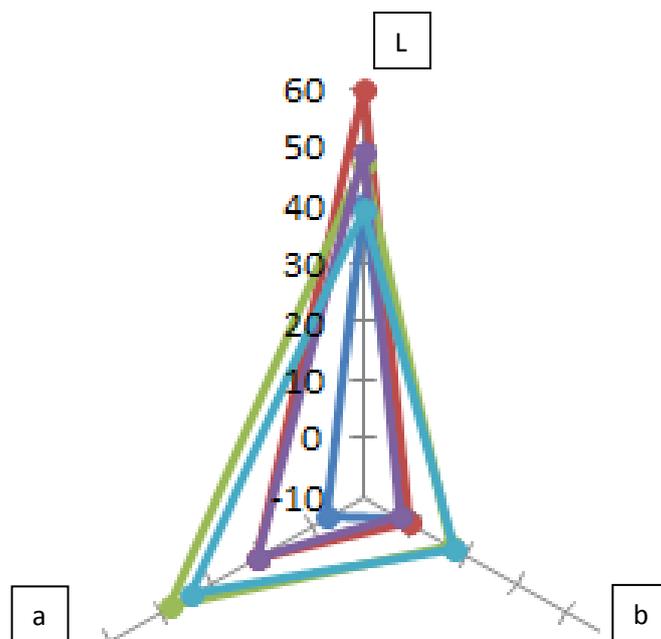


Figura 44. Representación comparativa de los parámetros de color para: producto fermentado suplementado con 50g/L (filtrada) (en azul oscuro), producto fermentado suplementado con 100g/L (filtrada) (en rojo), producto fermentado suplementado con melaza (filtrada)(en morado), zumo de fruta con leche (azul claro), bebida de café (verde).

Los valores de  $a^*$  indican verde si son negativos, mientras que los positivos indican rojo. Para el producto de las fermentaciones suplementadas con glucosa toma un valor negativo después de la filtración, asemejándose a los valores que toma este parámetro en la bebida de zumo de fruta y leche. La bebida con café con un valor alrededor de ocho es similar a los valores obtenidos para el medio suplementado con melaza.

En cuanto a los valores de  $b^*$ , indican azul si son negativos y amarillo si es positivo. Sólo hay un valor negativo, el del medio filtrado tras la fermentación suplementada con 50g/L de glucosa, después de la fermentación y la filtración. Los valores del medio sin suplementar con melaza como sin ella están alrededor de 2, valor similar al que toma

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este parámetro en la bebida de café. Los valores más altos son los tomados por las fermentaciones con melaza que varían del 28 a 32.

En la figura 45 se pueden observar los colores del producto después de filtrar.

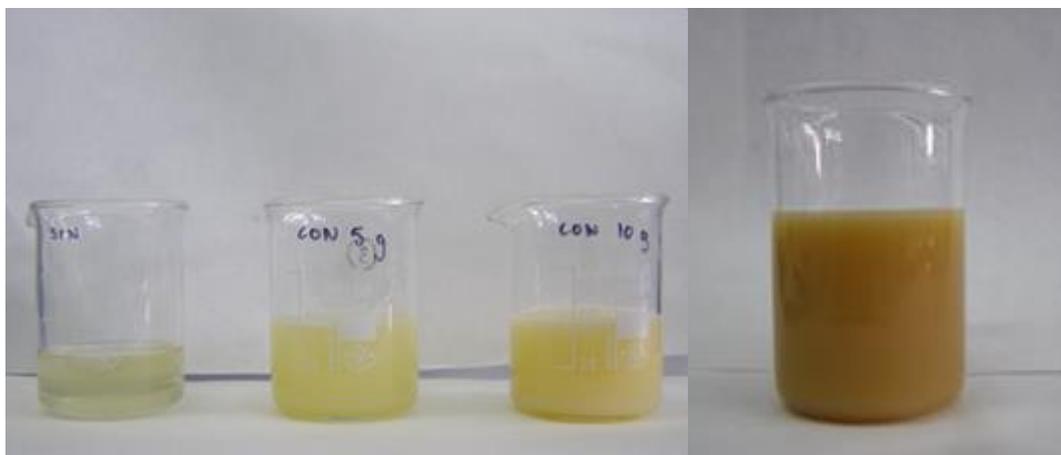


Figura 45. Productos de la fermentación después de filtrar.

### 3) Ácidos orgánicos:

Con el fin de profundizar en las propiedades organolépticas del producto, se ha hecho un primer estudio determinando la presencia/ausencia de algunos ácidos orgánicos.

En el medio inicial sin suplementación, tras los análisis para la determinación de ácidos orgánicos, aparece el ácido acético y ácido fórmico.

Tras la fermentación de la fracción acuosa sin suplementación aparece además el ácido láctico. Los mismos ácidos se observan en los productos de la fermentación de los medios suplementados con glucosa, si bien en este caso están presentes en diferentes concentraciones.

En el caso del medio suplementado con melaza no se observó presencia de ninguno de los ácidos analizados. Mientras que tras el proceso fermentativo se observó la aparición de ácido láctico, ácido acético y ácido cítrico. En este caso es destacable que aparece ácido cítrico característico de los productos tras una fermentación con melaza.

Los tiempos de retención de los patrones de los ácidos orgánicos empleados son: ácido láctico a los 27.5 min, ácido fórmico a los 11.4 min, ácido acético a los 33.5 min, ácido cítrico a los 15.9 min y ácido málico a los 20.5 min. Con estos tiempos de retención detectamos la presencia o ausencia de los ácidos orgánicos en los diferentes medios antes y después de la fermentación como se muestra en la figura 46.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

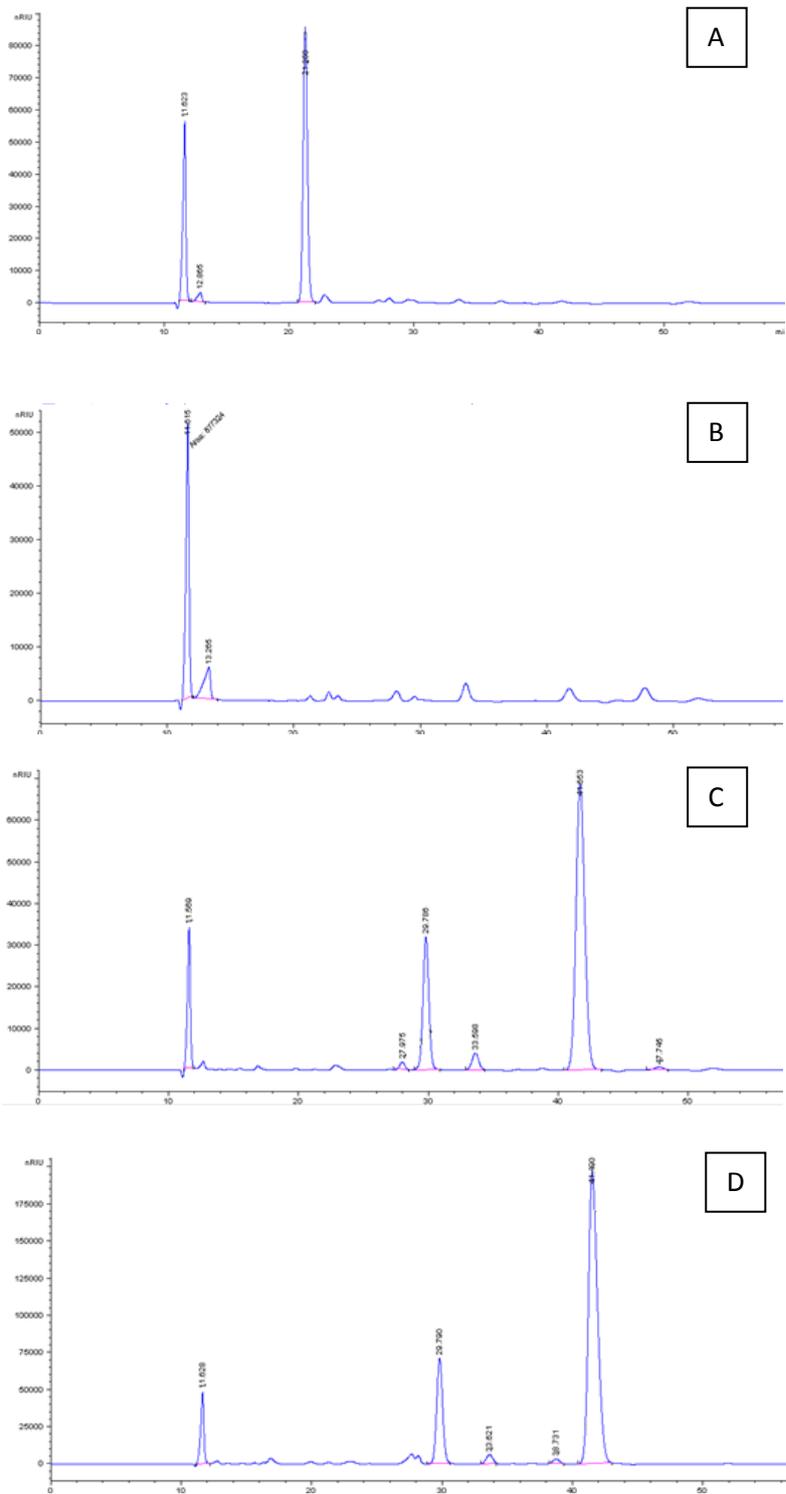


Figura 46. Presencia/ausencia de ácidos orgánicos. A. Fracción sin suplementar antes de fermentar. B. Producto fermentado sin suplementar. C. Producto fermentado suplementado con 50 g/L de glucosa. D. Producto fermentado suplementado con 100 g/L de glucosa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

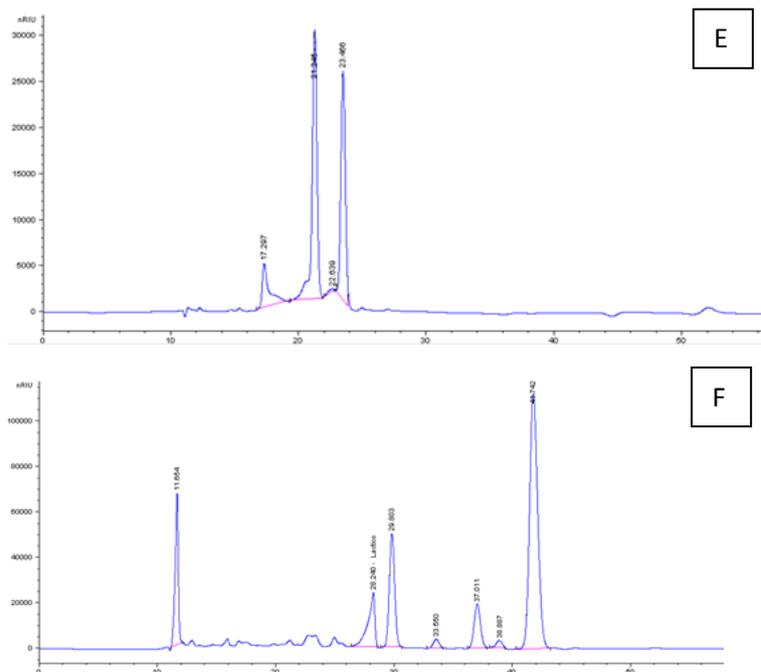


Figura 47. Presencia/ausencia de ácidos orgánicos. E. fracción suplementada con melaza antes de fermentar. F. Producto fermentado suplementado con melaza.

En la tabla 15 aparece un resumen de los ácidos orgánicos medidos indicando si están presentes o no en los diferentes medios.

Tabla 15. Presencia o ausencia de los diferentes ácidos orgánicos medidos.

	Ácido láctico	Ácido fórmico	Ácido acético	Ácido cítrico	Ácido málico
<b>Fracción sin suplementar antes de la fermentación</b>	-	+	+	-	-
<b>Fracción con melaza antes de la fermentación</b>	-	-	-	-	-
<b>Producto fermentado sin suplementar</b>	+	+	+	-	-
<b>Producto fermentado suplementado con 50g/L</b>	+	+	+	-	-
<b>Producto fermentado suplementado con 100g/L</b>	+	+	+	-	-
<b>Producto fermentado suplementado con melaza</b>	+	+	+	+	-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos de los ácidos orgánicos presentes en el medio tras haber sido fermentado aparecen en algunas bebidas fermentadas, tal es el caso del ácido acético y el láctico de la sidra, ambos en pequeñas cantidades ya que disminuyen su calidad, dándole un sabor demasiado ácido (García, 2014). En el sake aparecen el ácido acético y el cítrico, que le dan su sabor característico, presentes también en nuestro caso en el medio suplementado con melaza tras su fermentación ([diccionario.sensagent.com](http://diccionario.sensagent.com)). El ácido fórmico presente puede ser debido a la existencia de bacterias lácticas (Egusquiza, 2011), o también producido por las propias levaduras inoculadas, como ocurre en la cerveza (Suomalainen,1983)

5. CONCLUSIONES

- El efluente acuoso resultante del fraccionamiento de la yema del huevo, resultó ser adecuado para ser utilizado como base para la fermentación alcohólica, si bien debe ser suplementado con azúcares para que el proceso de fermentación se desarrolle de manera correcta y se obtenga un producto con una cierta graduación.
- Aunque la pasteurización durante 4 minutos a 80°C hizo disminuir los valores microbiológicos hasta los niveles establecidos por norma, además de la *Saccharomyces* inoculada, se observó el desarrollo de otros microorganismos, tanto bacterias como levaduras, con lo que para un mejor control del proceso se recomienda una pasteurización más intensa y un filtrado del producto final.
- Suplementado con glucosa o una fuente de azúcar residual como es la melaza se puede obtener una bebida alcohólica con una graduación entre 2,5 y 4,9 % (v/v), similar a la que presentan algunas bebidas alcohólicas comerciales como la cerveza y la sidra.
- El producto final presentó un aroma agradable y un color amarillo anaranjado, en el caso de la glucosa, y parduzco en el caso de la melaza, habiendo identificando la presencia ácido acético y láctico y en el caso de la melaza también ácido cítrico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alonso, et al. Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad del País Vasco. (2004)
- Anton, et al. Bioactive Egg Compounds. Ed Springer. Pág. 1-6. (2007)
- Ariaza, et al. Producción de proteína unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato. Tesis de pregrado Bacteriología. Departamento de Bacteriología. Colombia. (1997)
- Baudrit, et al, Empleo de melaza de caña de azúcar para la obtención y caracterización de poliuretanos potencialmente biodegradables. Revista Iberoamericana de Polímeros. (2008)
- Bayona, et al. Determining contaminating bacteria in the ethyl alcohol production process and their relationship to *Saccharomyces cerevisiae* flocculation. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería. (2002)
- Carballo. Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial. Editorial Acriba. España. (2000)
- Carmona, et al. La hidromiel y el vino, comparación de los aromas producidos durante el envejecimiento. Cátedra de Química Agrícola ETSI Agrónomos. Universidad de Castilla-La Mancha. (2002)
- Casamiquela, et al. Guía de elaboración de hidromiel y licor de miel. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina. (2008)
- Caso. Alteraciones y enfermedades microbianas asociadas a los alimentos. Master Biotecnología alimentaria. (2014)
- Castro. Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutírica. Tesis Pregrado Ingeniería Química. (1993)
- Colombié, et al. Online Estimation of Assimilable Nitrogen by Electrical Conductivity Measurement During Alcoholic Fermentation in Ecological Condition. INRA, UMR Sciences pour L'oenologie. Laboratoire de Biotchnologie de l'Enviroment. France. (2006)

## BIBLIOGRAFÍA

- Diaz. Equipos y Biorreactores en la Industria Alimentaria. Master en Biotecnología alimentaria. (2014)
- Emiro, et al. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche. (2003)
- Esquiza. Fermentación láctica de hexosas y pentosas. Capítulo III. (2001)
- Ferrer, et al. Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar. Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, La Universidad del Zulia, Venezuela. (2004)
- García, Industrias de bebidas. Master Biotecnología alimentaria. (2014)
- Genisheva, et al. Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells. Institute for Biotechnology and Bioengineering. Universidade do Minho. Portugal. (2013)
- Halasz, et al. Use of yeast biomass in food production. CRS Press. Boston. Estados Unidos. (1991)
- Instituto de e studios del huevo, El gran libro del huevo, Capítulo 3, 4 y 6. (2009)
- Laca, et al. Tratamiento de la yema de huevo mediante un proceso no agresivo destinado a la obtención de fracciones con valor añadido. Premio 08 a la Investigación. (2010)
- Nuevo, et al .Revalorización de subproductos en el sector de producción de huevos. Asociación ASEPRHU. Circulo de Innovación Tecnológica. Informe de vigilancia tecnológica. Comunidad de Madrid. (2014)
- Panreac. “Determinación del azúcar total por el método de Rebelein”. Vinikit. (2010)
- Rendueles. Industrias cárnicas, de pescado y del huevo. Industrias Alimentarias. Máster de Biotecnología Alimentaria (2014)

## BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez. Crecimiento microbiano: concepto y consideraciones generales. Departamento de microbiología de la Universidad de Granada. (2014)
- Stryer, et al. Bioquímica. Editorial Reverté. Sexta edición. (2007)
- Suárez. “Calificación analítica y sensorial de sidras amparadas por la DOP “Sidra de Asturias”. Tecnología agroalimentaria. 2ª época, número 3. SERIDA, (2006).
- Sugino, et al. General chemical composition of hen eggs. Chapter 2. (1997)
- Suomalainen. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Editorial CIP. (1983)
- Swan, et al. Las melazas y sus derivados. Revista Tecnológica. Geplacea. (1994)
- Tuite, et al. Saccharomyces cerevisiae. Editorial Plenum Press. New York, Estados Unidos. (1991)
- Vericad, Formulario de licorería. Editorial reverté. Facultad de ciencias de Barcelona (2004)
- Zurdo, et al. El libro de los licores de España. Guía práctica. Editorial Robinbook. (2004)

### Consultas en internet:

- Denominación de origen calificada. Normas relativas al proceso de calificación de los vinos de la d.o.ca. Rioja. En: [es.riojawine.com/es/paginas/229-normas-relativas-al-proceso-de-calificacion-de-los-vinos-de-la-d-o-c-rioja.html](http://es.riojawine.com/es/paginas/229-normas-relativas-al-proceso-de-calificacion-de-los-vinos-de-la-d-o-c-rioja.html). Consultado el 29 de Junio 2014.
- Pedraglio. Algunas cosas que debe saber sobre el huevo. En: [www.gallospedragliofarm.com/algunascosadelhuevo.htm](http://www.gallospedragliofarm.com/algunascosadelhuevo.htm). Consultado el 9 de Julio de 2014.
- Sensagent.Fermentaciónalcohólica.<http://diccionario.sensagent.com/fermentacion-alcoholica/es-es/>. Consultado el 30 de Junio de 2014