

# Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para la elaboración de hidromiel

Andrés Mauricio Martínez Hoyos, Giordan Vivas Espitia, Marta Cecilia Quicazán

## RESUMEN

**El objetivo de esta investigación es comparar el efecto que presenta el uso de células libres y células inmovilizadas durante el proceso de elaboración de una bebida alcohólica a partir de miel conocida como hidromiel. Se conoce que el uso de células inmovilizadas puede favorecer los procesos de fermentación logrando una mayor estabilidad celular, bajos costos de recuperación, reutilización de la biomasa y protección de las células contra el estrés del ambiente, así como un incremento de la productividad y el rendimiento del producto. En este trabajo también se evaluará la viabilidad de reutilizar las células en nuevas fermentaciones y sus efectos bajo parámetros de calidad, productividad y rendimiento.**

**Palabras Clave—** alginato de sodio, carragenina, miel.

## I. INTRODUCCIÓN

La hidromiel es el producto resultante de la fermentación de miel diluida que alcanza una concentración entre el 8% y el 18 % v/v de etanol, esta bebida se elabora normalmente de manera artesanal, por lo que la información existente respecto a las condiciones de su producción es limitada y existen vacíos de conocimiento relacionados con la formulación apropiada y optimización de su proceso [1].

Tradicionalmente este tipo de fermentación se realiza mediante el uso de células libres, método que consiste en inocular el mosto (miel diluida en agua) directamente con la levadura; este tipo de proceso presenta algunos inconvenientes tales como riesgos de contaminación, dificultad de separación de las células al finalizar el proceso, alto costo del reciclaje microbiano, pérdida de biomasa y una respuesta adversa por la variación ambiental [2].

Como alternativa al uso de células libres está el uso de células inmovilizadas; técnica que consiste en encerrar la célula en una matriz brindándole protección a la vez que ofrece diversas ventajas técnicas y económicas, que solucionan la mayoría de los inconvenientes presentados en la fermentación tradicional con células libres [3].

Una de las matrices más utilizadas en la inmovilización son los geles de Alginato; sin embargo existen otro tipo de materiales que pueden ser utilizados como soporte para la inmovilización de células tales como pellets de gluten, pectato y carragenina [2]–[4]. El uso de células inmovilizadas en la producción de hidromiel ha sido estudiado con matrices tales como geles de pectato de calcio[5], alginato de calcio [6] y alginato–quitosano [7].

Con base en lo anterior, el presente proyecto de investigación pretende contribuir al conocimiento del proceso de fermentación alcohólica de la miel, realizando una comparación entre el uso de células libres y células inmovilizadas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante la evaluación de parámetros fisicoquímicos y sensoriales en el proceso de fermentación y de igual manera aportar al desarrollo y crecimiento de la cadena apícola en Colombia.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de producción de la hidromiel con uso de células libres puede presentar inconvenientes como la falta de uniformidad en el producto final, retraso y detenimiento de las fermentaciones e incluso producción de malos sabores por parte de las levadura [8]. Estos problemas se asocian principalmente con la incapacidad de adaptación de las cepas de levadura a las condiciones y factores del medio, por ejemplo el estrés ambiental el cual disminuye el crecimiento y la productividad del proceso, generando mayores costos de producción [9].

La fermentación del hidromiel también se puede desarrollar mediante el uso de células inmovilizadas; existen diferentes materiales de soporte y tecnologías de inmovilización para la producción de bebidas alcohólicas que ayudan a mejorar el proceso de producción y a solucionar algunos de los problemas generados utilizando células libres [3]; sin embargo respecto a la producción de hidromiel el uso de células inmovilizadas es un campo poco estudiado. Con base en lo anterior, este trabajo de investigación pretende contribuir al conocimiento de los procesos de fermentación alcohólica a

Andrés Mauricio Martínez Hoyos: [ammartinezh@unal.edu.co](mailto:ammartinezh@unal.edu.co), Estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

Giordan Javier Vivas Espitia: [givivase@unal.edu.co](mailto:givivase@unal.edu.co), estudiante de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

Marta Cecilia Quicazan: [mcquicazand@unal.edu.co](mailto:mcquicazand@unal.edu.co), Profesora asociada, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

partir de miel comparando el uso de células libres y células inmovilizadas mediante parámetros de calidad, productividad, rentabilidad y la capacidad de estas últimas para ser reutilizadas en nuevas fermentaciones.

### III. HIPOTESIS

Los estudios a realizar en el presente proyecto están dirigidos a determinar si existen diferencias fisicoquímicas y sensoriales en el proceso de elaboración de hidromiel utilizando células libres o células inmovilizadas.

### IV. METODOLOGIA

Este trabajo se desarrollará en la planta piloto de vegetales y en el laboratorio de análisis de alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

#### Materias primas

La miel y el polen serán adquiridos en apiarios del municipio de San Mateo del departamento de Boyacá. Se realizarán los análisis fisicoquímicos necesarios para el cumplimiento de la normatividad vigente [10], [11]. Se utilizará levadura *Saccharomyces cerevisiae*, raza fisiológica *bayanus* usada en procesos de fermentación para la obtención de bebidas alcohólicas y licores tipo vino. Como matrices para el proceso de inmovilización se trabajará con dos tipos de polisacáridos: carragenina y alginato de sodio.

#### Proceso de fermentación

La miel y el Mielato serán diluidos en agua hasta una concentración de 24° Brix, posteriormente se agregará polen como fuente de nitrógeno en relación de 4g/l; esta mezcla será sometida a un proceso de pasterización a 65°C durante 20 minutos y a un proceso de enfriamiento rápido para lograr la destrucción de la flora natural presente en la mezcla. Todos los recipientes y utensilios utilizados serán previamente esterilizados. La activación de la levadura se realizará en un volumen igual al 10 % del mosto usando una concentración de levadura de 0.5 g/l del mosto final. Las temperaturas manejadas durante el proceso de fermentación corresponderán a 25 y 30 °C.

#### Procesos de inmovilización

Para la inmovilización en alginato se preparará una solución de alginato de sodio al 3% m/v a la cual se le adicionará una suspensión de levaduras activada previamente en un 5 % del volumen final del mosto, consiguiendo una mezcla al 1.5% m/v de alginato de sodio y una concentración de levadura de 0.5 g/l de mosto. Esta mezcla se hará gotear con ayuda de una bomba peristáltica sobre una solución esterilizada de cloruro de calcio 0.05 M para obtener las esferas con las células encapsuladas dejándose en refrigeración durante 24 horas con el fin de que adquirieran consistencia y mayor estabilidad [12]. Posteriormente, las esferas se lavarán con agua destilada y se adicionarán a los fermentadores correspondientes.

Para el proceso de inmovilización con carragenina se evaluarán distintas concentraciones de carragenina y sal de cloruro de potasio [13]. A las esferas formadas se les evaluará

las características de forma, resistencia al tacto y su estabilidad en contacto con el mosto de fermentación. Una vez encontrada la concentración más adecuada será utilizada como biocatalizador en el proceso fermentativo.

#### Reutilización de células en nuevas fermentaciones

Terminada la primera fermentación, las células inmovilizadas serán reutilizadas en nuevas fermentaciones. En cada fermentación se realizará seguimiento de los parámetros de rendimiento y productividad. Hacia el final de cada lote el líquido de fermentación será separado y el biocatalizador se lavará con agua destilada para reutilizarse en una nueva fermentación [14].

#### Evaluación del proceso de fermentación

Se llevará a cabo una cinética de la fermentación del mosto, analizando las concentraciones de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) y de etanol. La determinación del azúcar se realizará con el método AOAC 977.20 [15]. Además, se realizará un seguimiento a los parámetros de pH, acidez titulable, acidez volátil, ácidos orgánicos y grado alcohólico a lo largo del proceso de fermentación y un análisis sensorial del producto final.

### V. RESULTADOS ESPERADOS

Se espera que al finalizar la presente investigación se pueda determinar si existen diferencias en los parámetros de rendimiento, productividad o calidad sensorial al comparar los procesos fermentativos con células libres o células inmovilizadas en alginato o carragenina durante la elaboración de hidromiel.

### VI. IMPACTO DEL PROYECTO

El desarrollo de esta investigación busca sentar bases de conocimiento en lo relacionado con los procesos de elaboración de una bebida alcohólica tipo vino a partir de la miel. Los resultados obtenidos permitirán futuras investigaciones relacionadas con el mejoramiento del proceso o el escalamiento de los métodos utilizados en esta investigación.

### AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional sede Bogotá -DIB y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias.

### REFERENCIAS

- [1] T. Gomes, "Produção de hidromel: efeito das condições de fermentação," Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Escola Superior Agrária de Braganca, Braganca, 2010.
- [2] S. J. Sarma, M. Verma, and S. Brar, "Industrial Fermentation for Production of Alcoholic Beverages," in *Fermentation Processes Engineering in the Food*

- Industry*, C. R. Soccol, A. Pandey, and C. Larroche, Eds. CRC Press, 2013, pp. 299–322.
- [3] Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I. Banat, R. Marchant, and A. Koutinas, “Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review,” *Food Microbiol.*, vol. 21, no. 4, pp. 377–397, Aug. 2004.
- [4] J. Tampion and M. D. Tampion, “Immobilized Cells: Principles and Applications,” Cambridge University Press, 1987, pp. 135–162.
- [5] M. Navrátil, E. Šturdík, and P. Gemeiner, “Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, pp. 977–982, 2001.
- [6] N. Qureshi and D. V. Tamhane, “Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 280–281, Mar. 1985.
- [7] A. P. Pereira, A. Mendes-Ferreira, J. Oliveira, L. Estevinho, and A. Mendes-Faia, “Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 56, pp. 21–30, Apr. 2014.
- [8] A. P. Pereira, T. D. Dias, J. Andrade, E. Ramalhosa, and L. Estevinho, “Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, pp. 2057–2063, 2009.
- [9] A. Mendes-Ferreira, F. Cosme, C. Barbosa, V. Falco, A. Inês, and A. Mendes-Faia, “Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, no. 1, pp. 193–198, Nov. 2010.
- [10] Ministerio de la protección social, *Resolucion 1057*. Colombia, 2010.
- [11] ICONTEC, “NTC 1273. Miel de abejas.” Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, Bogota D.C, 2007.
- [12] L. A. Caicedo M, “Estudio comparativo de la generación de CO<sub>2</sub> en fermentaciones con células libres e inmovilizadas de *Zygomonas mobilis*,” *Rev. Ing. e Investig.*, p. 23, 1996.
- [13] J. C. T. Dias, R. P. Rezende, and V. R. Linardi, “Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida guilliermondii* ufmg-y65 immobilized in alginate,  $\kappa$ -carrageenan and citric pectin,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 31, pp. 61–66, 2000.
- [14] Y. Kourkoutas, M. Komaitis, A. A. Koutinas, A. Kaliafas, M. Kanellaki, R. Marchant, and I. M. Banat, “Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C,” *Food Chem.*, vol. 82, pp. 353–360, 2003.
- [15] AOAC, “Official Method 977.20, Separation of Sugars in Honey, Liquid Chromatographic Method,” in *AOAC*, Edición 19., G. W. Latimer, Ed. 2012.