

## **Diseño de una Bebida Alcohólica Fermentada a Base de Miel**

Pedro Javier Reinoso Bernal

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

- Diseñar una bebida alcohólica fermentada a base de miel mediante la aplicación de un diseño factorial.

#### **Objetivos específicos**

- Analizar las principales características físico-químicas de las mieles usadas en el diseño.
- Identificar las características principales del producto terminado y analizar su comportamiento con respecto a las características de la miel.
- Realizar un diseño factorial variando la relación de agua miel inicial, cantidad de nutriente y tipo de miel para cada propiedad identificada del producto final con el fin de evidenciar el efecto de las características iniciales de cada una de las mieles.

# **Diseño de una Bebida Alcohólica Fermentada a Base de Miel**

Pedro Javier Reinoso Bernal

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes

## **Resumen**

Para el diseño de una bebida alcohólica fermentada a base de miel, denominada como hidromiel se realizó la caracterización físico-química de dos mieles obtenidas de dos apícolas colombianas, Zunuba y Jardín de las Abejas, el proceso de fermentación según los experimentos definidos por un diseño factorial y su respectiva caracterización final, en donde se analizó el contenido de alcohol, el pH y la acidez titulable. Además, se realizó el análisis de tres diseños experimentales donde se fijaron como variables de respuesta los parámetros analizados en la caracterización del producto final. El diseño factorial realizado tenía tres factores: relación agua-miel, cantidad de nutrientes y tipo de miel; cada uno con dos niveles, 23 °Bx y 25 °Bx, 1g/L y 2 g/L, y la miel de Zunuba y la miel de Jardín de las Abejas, respectivamente. Según el análisis realizado, se encontró que en la caracterización físico-química la miel de Zunuba sobrepasó el parámetro de acidez libre con un valor de 56.15 meq de ácido/kg y los demás parámetros estuvieron dentro de los rangos establecidos por la normatividad colombiana. En la caracterización del producto final, se identificó que la miel de Jardín de las Abejas presentó problemas en la fermentación debido a la disminución de pH, lo que generó que las levaduras se desactivaran. Para este comportamiento se determinó que fue producto de la baja concentración de minerales presentes en la miel, los cuales no ayudaron a generar un amortiguamiento para el pH. Además, se observó que con exceso de nutrientes las fermentaciones tuvieron el mayor obtenido de alcohol, de 12.58% para Zunuba y 9.19% para Jardín, sin embargo, es necesario un estudio más especializado para identificar la producción de sustancias no deseadas que puedan llegar a afectar las características organolépticas del producto final.

**Palabras clave:** Hidromiel, miel, caracterización físico química, caracterización del producto final, diseño factorial, diseño multi escala.

## **1. Introducción**

El hidromiel es una bebida alcohólica fermentada a base de miel con un rango de alcohol en volumen de 3,5-18% v/v [1], la cual está datada como la primera bebida de estas características en la historia, anteponiéndose al vino y la cerveza [2]. Debido a esto, ha tenido un gran valor cultural, social y religioso en gran parte de las civilizaciones a través de la historia de la humanidad como para los griegos, romanos y nórdicos. En la actualidad, hay un interés cada vez mayor en el hidromiel como un producto de gran valor agregado a nivel mundial [3]. Por ejemplo, en Estados Unidos para el 2012

se tenía una producción de 404 cajas en promedio por productor. Este valor aumentó a 823 cajas en promedio en el 2013. Además, se considera que la industria del hidromiel es el segmento de la industria licorera de los Estados Unidos con mayor crecimiento en este momento [4].

En Colombia, se estima una producción de miel de 3000 toneladas anuales [5]. Gracias a su gran oferta, existen iniciativas para generar un valor agregado a esta materia prima en la industria de los licores y para incentivar proyectos para la producción de esta bebida principalmente para los pequeños productores. La Universidad Nacional de Colombia y su Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos han venido desarrollando modelos de producción para generar un impacto y mayor competitividad en el mercado del hidromiel. Además, en el país se está incrementando el interés y las ventas de las bebidas vínicas aproximadamente en un 7% anual. Por lo tanto, es de gran importancia estudiar el desarrollo científico y de proceso de la elaboración del hidromiel para aprovechar el potencial de la miel como materia prima. Para esto se utilizó el concepto de diseño multi-escala el cual relaciona el diseño de productos y procesos con mayor enfoque a los fenómenos presentes desde una etapa molecular hasta la etapa macroscópica [6].

## **2. Revisión Bibliográfica**

Teniendo en cuenta el diseño multiescala a desarrollar, es necesario dividir el proceso en términos de: materias primas, proceso de fermentación y producto terminado. En las materias primas encontramos la miel y su respectiva caracterización fisicoquímica, las levaduras y los nutrientes a utilizar para la formulación del mosto. En el proceso de fermentación se definen los factores de operación de importancia para el estudio y el proceso mismo. Por último, en el producto terminado, se determinarán los análisis necesarios para identificar los efectos de cada uno de los parámetros identificados en las materias primas y los factores del proceso de fermentación.

### **2.1. Materias Primas**

#### **2.1.1. Miel**

La miel es un producto alimenticio producido por la abeja *Apis Mellifera* a partir del néctar de las flores o secreciones de origen vegetal. Está compuesto principalmente por azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, y en menor cantidad azúcares más complejos, como la sacarosa [7]. A lo largo de la historia de la humanidad, la miel ha sido utilizada como endulzante y medicamento por sus propiedades antisépticas y antioxidantes [8]. Debido a la alta concentración de azúcares simples dentro de la miel, ésta sirve como materia prima para el proceso de fermentación alcohólica para la producción de una bebida denominada como hidromiel.

### **2.1.2. Caracterización Físicoquímica de la Miel**

La caracterización de la miel se divide en cinco propiedades principales a tener en cuenta, las cuales están enfocadas principalmente en su estabilidad y en el efecto significativo del proceso de fermentación.

#### **2.1.2.1. pH y Acidez Libre**

La acidez es una característica importante debido a su relación con la estabilidad microbiana, las macroestructuras en la miel y su efecto dentro del proceso de fermentación [2] [9] [10]. Es importante identificar esta propiedad por criterios de almacenamiento de la materia prima y su efecto en las características organolépticas del producto, principalmente en el sabor y el cuerpo [11]. En términos técnicos, el pH de la miel tiene que estar en un rango de 3.4 y 6.1. Por otro lado, la acidez total dentro de la miel no debe exceder 50 miliequivalentes por kilogramo [12].

#### **2.1.2.2. Conductividad Eléctrica**

La conductividad depende fuertemente de la presencia de sales minerales, ácidos orgánicos, proteínas y polioles. Por lo tanto, este parámetro se identifica para determinar la cantidad de sales minerales presentes en la miel. Los valores de conductividad eléctrica en las mieles dependen del origen floral [11].

#### **2.1.2.3. Contenido de Azúcares (Glucosa, Fructosa y Sacarosa)**

Los azúcares componen aproximadamente el 99% de la materia seca de la miel, en donde se encuentran: glucosa, fructosa, sacarosa y trazas de otros disacáridos y trisacáridos. El contenido de azúcares en la miel depende de su origen floral y del origen geográfico, en menor manera. En la mayoría de estudios, se ha identificado que el azúcar en mayor proporción es la fructosa con aproximadamente un 38%, seguido por la glucosa en un 31%, con excepciones muy específicas como las mieles de diente de león y de canola [11].

#### **2.1.2.4. Humedad**

El contenido de agua dentro la miel depende principalmente del origen, su almacenamiento y del grado de maduración alcanzado dentro de la colmena. El rango usual de humedad para la miel es de 13% a 25%. Este parámetro es importante debido a la estabilidad microbiológica y los posibles métodos de conservación y almacenamiento a los que tiene que someterse debido a la posibilidad de fermentación gracias a la presencia de microorganismos [11].

#### **2.1.2.5. Sólidos Insolubles**

Este parámetro se tiene en cuenta para identificar la cantidad de impurezas y material indeseado presente en la miel [11].

### 2.1.3. Levadura

Existen diversas levaduras en el mercado como la *Saccharomyces Cerevisiae*,. usada principalmente para la fermentación de vinos y cerveza, y la *Saccharomyces Bayanus*, también utilizada en la producción de vinos, entre otros [13].

El pH dentro del mosto en donde se va a llevar a cabo la fermentación tiene efecto en la velocidad de crecimiento de las levaduras y en su desactivación. Esto se debe a que las interacciones intracelulares y extracelulares del metabolismo propio de las células se ven afectados por los gradientes de concentración de iones hidrógeno y la disociación de ácidos y bases. Para las levaduras, el pH propicio para un buen funcionamiento se encuentra en un rango entre 4 y 5. Por otro lado, la temperatura también genera un efecto en la velocidad de crecimiento, definido por la ley de Arrhenius. Así mismo, afecta también en parte de los subproductos de la fermentación, principalmente en vinos blancos, que tienen importancia en las características organolépticas del producto, como: ésteres, acetatos, entre otros [13]. Para el caso de estudio, se va a utilizar una cepa de levadura *Saccharomyces Bayanus* VR 44 de Springer Oenologie, debido a sus aptitudes fermentativas a diferentes condiciones de operación. Esta cepa cuenta con las siguientes características [14]:

- Habilidades de fermentación:
  - Buena implantación y rápido arranque de fermentación.
  - Fermentación regular y completa de los azúcares.
  - Temperatura de fermentación entre 10°C y 40°C.
  - Poder alcohólico de 16% ABV.
  - Bajos requerimientos de nitrógeno.
- Características metabólicas:
  - Rendimiento azúcar/alcohol: 16,5 j/L por grado alcohólico en volumen.
  - Baja producción de acetaldehído, menor a 30 mg/L.
  - Baja producción de SO<sub>2</sub>.
  - Baja producción de acidez volátil, menor al 0,24 g/L.
  - Baja producción de espuma.

## 2.2. Proceso de Fermentación

La fermentación alcohólica se realiza por medio del proceso metabólico de respiración anaeróbica de las levaduras. Estas utilizan los azúcares presentes en el medio donde se encuentren como sustrato para procesarlo y producir energía, dióxido de carbono, etanol y otros subproductos [15]. Los principales factores del diseño se enfocan principalmente en la relación de agua y miel para la dilución que se va a definir como mosto y las características fisicoquímicas asociadas importantes para el

seguimiento durante el proceso. También los nutrientes y la oxigenación del mosto son parámetros necesarios para asegurar una buena fermentación. Por último, la cantidad de levadura se define dependiendo del volumen de mosto especificado por especificaciones del fabricante.

### **2.2.1. Relación Agua-Miel**

La determinación de la cantidad de agua necesaria para la dilución con la miel depende del enfoque que se le quiera dar al producto terminado en términos de sabor, tiempo de fermentación que se proponga, el tipo de miel usada y cantidad de alcohol final. Según esto, las recetas utilizadas en la industria no coinciden entre ellas ya que no se puede estipular parámetros iguales para cada uno de los mostos a realizar. Por esta razón, la relación no se realiza en términos de agua y miel en dilución sino por la gravedad específica del mosto. Esta medida muestra la cantidad de azúcar presente en la solución y se mide en grados Brix, gravedad específica o Plato. Teniendo esto en cuenta, por la variabilidad de la gravedad específica del mosto en términos de relaciones agua miel, se utiliza para el estudio inicialmente un valor propuesto por Ken Schramm para un mosto genérico de gravedad específica entre 23 °Bx y 25 °Bx [2].

### **2.2.2. Nutrientes**

Para una fermentación sana y activa, es necesaria la adición de nutrientes como suplemento de nitrógeno necesario para el metabolismo reproductivo de las levaduras. En términos teóricos, el tipo de nitrógeno que requieren las levaduras se denomina Nitrógeno Amino Libre (FAN, por sus siglas en inglés). Para suplir las necesidades de las levaduras en la fermentación, se tiene que administrar como mínimo 130 mg/L de FAN al mosto. Dentro de la miel se encuentran aminoácidos, los cuales no son suficiente fuente de nitrógeno, por lo tanto, es necesario el uso de fuentes externas de compuestos nitrogenados. Existen en el mercado aditivos con diferentes compuestos que ayudan a la fermentación, los cuales principalmente están constituidos por aminas como el fosfato diamónico y el sulfato de amonio. Actualmente se utiliza preferiblemente el fosfato diamónico. Este provee 258 mg/L de FAN al mosto en una tasa de 1 g/L [2].

### **2.2.3. Oxigenación del Mosto**

Para realizar un inicio de fermentación fuerte y asegurar la reproducción inicial de la población de levadura, es necesaria la oxigenación del mosto. Al comienzo de la fermentación se necesita que la población de levaduras aumente rápidamente, pero ya que la respiración anaeróbica genera menor cantidad de energía que la respiración aeróbica, sin la presencia de oxígeno el crecimiento no es tan alto. Por lo tanto, es necesario añadir oxígeno al mosto con el fin de que las levaduras lo usen en las etapas tempranas de la fermentación y se reproduzcan en una velocidad alta. Este oxígeno no afecta la fermentación posterior debido a que el proceso se realiza en un contenedor cerrado y no existe más

flujo de este dentro del mosto, por lo tanto, posterior al agotamiento del oxígeno, se sigue normal la fermentación anaeróbica. Usualmente, para este proceso, se llega hasta el punto de saturación con oxígeno el mosto, lo cual conlleva a añadir aire aproximadamente por 15 minutos dentro de la solución [2].

#### **2.2.4. Cantidad de Levadura**

La cantidad de levadura usada depende de las indicaciones del fabricante. En el caso de la cepa usada se define que se utilizan 20 g/hL [14].

### **2.3. Caracterización del Producto Terminado**

#### **2.3.1. Alcohol alcanzado**

Como bebida alcohólica, es de suma importancia identificar la concentración del alcohol a la que se llega en el proceso, lo cual depende principalmente de la tolerancia de la levadura utilizada y del tiempo de fermentación definido. En Colombia, no existe legislación con respecto al alcohol necesario para denominar un producto fermentado a base de miel como tal. Según el decreto 1686 del 2012, el vino de uvas mínimo tiene que tener 6% ABV [16]. Pero según la Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines, Mead Style Guidelines, se define que un hidromiel tiene que estar entre 3,5% y 18% ABV [1].

#### **2.3.2. pH y Acidez**

El seguimiento de este parámetro se realiza para identificar el cambio de esta propiedad con respecto a lo identificado en la etapa previa a la fermentación. El valor final obtenido para estos parámetros ayudará a definir si es necesario añadir algún nivelador de pH para llegar a los rangos normales para asegurar buenas características de sabor principalmente.

### **3. Materiales**

Para el desarrollo de las pruebas y experimentación se utilizaron los laboratorios de Procesos Químicos y Biotecnología del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de los Andes. Las mieles fueron proporcionadas por Zunuba y Jardín de las Abejas. Para las pruebas realizadas a la miel, se utilizó agua deionizada, hidróxido de sodio y los instrumentos de laboratorio necesarios proporcionados por la Universidad de los Andes. La levadura utilizada fue la cepa VR-44 de Springer Oenologie y el nutriente fue fosfato diamónico suministrado por Químicos Campota. Para el diseño experimental se utilizaron 16 envases de vidrio de 500 mL suministrados por Discordoba.

## 4. Métodos

### 4.1. Caracterización Físicoquímica de la Miel

#### 4.1.1. pH y Acidez Libre

Para determinar el pH de la miel se realizó una dilución de 10 g de miel en 75 mL de agua destilada y con agitación lenta usando un pHmetro Mettler Toledo SevenMulti. Para la acidez libre se añadió NaOH 0.1 M monitoreando el pH hasta alcanzar 8.3 usando una bureta de 25 mL. El volumen usado de la base se utilizó para obtener la acidez libre según la ecuación (1):

$$V_{NaOH} * 10 = \frac{meq \text{ de acidez}}{kg \text{ miel}} \quad (1)$$

El valor de pH se reporta a dos cifras significativas y el de acidez libre se reporta como miliequivalentes de ácido por kilogramo de miel [17].

#### 4.1.2. Conductividad Eléctrica

Para determinar la conductividad eléctrica se realizó una dilución de 25,17 g de miel en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, en un beaker se agregó 40 mL de la solución y con lo demás se enjuagó la celda del conductímetro Mettler Toledo SevenMulti. Al realizar la prueba de la conductividad se tomó también la temperatura de la muestra para el ajuste de datos según las ecuaciones (2) y (3) [17]:

- Para una temperatura menor a 20°C:

$$x_i((1 - 3.2\%) * |\Delta T|) = x_f \quad (2)$$

- Para una temperatura mayor a 20°C

$$x_i(3.2\% * |\Delta T|) = x_f \quad (3)$$

#### 4.1.3. Contenido de Azúcares (Glucosa, Fructosa y Sacarosa)

Para la caracterización de los azúcares se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1260 Infinity con una columna Aminex HPX-87H de 7.8x300 mm. Para la configuración del cromatógrafo se usaron las siguientes condiciones:

- Flujo: 0,5 mL/min
- Volumen del eluyente inyectado: 500 µL
- Temperatura de la columna: 25 °C
- Temperatura del detector: 25 °C
- Tiempo de corrida: 35 min
- Tiempo de regeneración: 40 min



- Fase de regeneración: NaOH a 200 mM
- Fase móvil: NaOH 15 mM

Para las muestras de miel se realizó una dilución de 0,5 g de miel en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se filtró el volumen de muestra a utilizar y se colocó en el cromatógrafo [18].

#### **4.1.4. Humedad**

Para determinar la humedad de la miel, se realizó un método refractométrico usando un refractómetro digital Mettler Toledo 30GS. Para esto se tomó una muestra de miel y se calentó en un baño termostático a 60 °C para asegurar que no hubiese cristales suspendidos. Luego se llevó la muestra a un baño de ultrasonido para eliminar las burbujas dentro de la muestra. Se llevó a temperatura ambiente y se midió el índice de refracción. Posteriormente, se compararon los valores del índice de refracción obtenido con los valores tabulados en el manual técnico de International Honey Commission [17].

#### **4.1.5. Sólidos Insolubles**

Para determinar la cantidad de sólidos insolubles, se utilizaron crisoles sinterizados con poros de 22 micras previamente secados. Para el secado, se introdujeron los crisoles en una mufla a 135°C durante 90 minutos y luego se llevaron a desecador. Posteriormente, se pesaron y se llevaron a la mufla otra vez por 30 minutos. Este procedimiento se realizó hasta que el peso de los crisoles no cambiara. Posteriormente, se realizó una dilución de 20 g de miel en 200 mL de agua a 80°C y luego se filtró al vacío en los crisoles previamente pesados. Después de filtrar toda la muestra, se lavó el crisol con abundante agua tibia para retirar la mayor cantidad de azúcares retenidos en el filtro. Por último, se pesaron de nuevo los crisoles. El porcentaje de sólidos insolubles se obtuvo mediante la ecuación (4):

$$\% \text{ de sólidos insolubles} = \frac{m_{cf} - m_{ci}}{m_i} * 100 \quad (4)$$

Donde  $m_{ci}$  es la masa del crisol antes del filtrado,  $m_{cf}$  la masa del crisol después del filtrado y  $m_i$  la masa de miel inicial [17].

#### **4.2. Proceso de Fermentación**

Para el proceso de fermentación se implementó un diseño factorial con 3 factores de 2 niveles cada uno. La Tabla 1 muestra cómo se realizó la distribución de experimentos. Para cada una de las muestras se fijó un volumen de 100 mL. Para el diseño se realizó una réplica para mayor exactitud, por ende, se obtuvieron 16 muestras al final. El montaje experimental se muestra en la Figura 1.

**Tabla 1.** Diseño factorial 2<sup>3</sup> propuesto

<b>No. De Experimento</b>	<b>Contenido de Azúcar</b>	<b>Cantidad de Nutriente</b>	<b>Tipo de Miel</b>
<b>1</b>	23	2 g/L	Zunuba
<b>2</b>	25	2 g/L	Zunuba
<b>3</b>	23	1 g/L	Zunuba
<b>4</b>	25	1 g/L	Zunuba
<b>5</b>	23	2 g/L	Jardín de las Abejas
<b>6</b>	25	2 g/L	Jardín de las Abejas
<b>7</b>	23	1 g/L	Jardín de las Abejas
<b>8</b>	25	1 g/L	Jardín de las Abejas

Para cada una de las fermentaciones descritas para el diseño se llevó a cabo el proceso descrito a continuación. Para las diluciones de 25 y 23 °Bx se estimó inicialmente relaciones volumétricas de agua miel de 3:1 y 3.5:1 respectivamente, y se llegó al contenido de azúcares deseado añadiendo agua en proporciones de 10 mL, midiendo cada vez que se diluía. Esta dilución se llevó a cabo en una plancha de calentamiento a 60°C por 10 minutos retirando la espuma producida [2]. Esta temperatura se utilizó para matar la mayor cantidad de microorganismos y levaduras salvajes que posiblemente están presentes en la miel. Después, se retiró de la fuente de calor y se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente para poder añadir la levadura inoculada.

Una vez los mostos alcanzaron temperatura ambiente, se procedió a la inoculación de la levadura, llevada a cabo según instrucciones del fabricante [14]. Se pesó la cantidad correspondiente de fosfato diamónico como fuente de amino nitrógeno libre. Por último, se oxigenó el mosto agregando aire directamente al mosto usando una manguera durante 15 minutos para llegar a la saturación de oxígeno [2]. Con todo esto, se procedió a añadir la levadura dentro del mosto preparado para iniciar la fermentación.



Figura 1. Montaje experimental para el diseño factorial

### 4.3. Caracterización del Producto Terminado

#### 4.3.1. Contenido de alcohol

Para determinar el nivel de alcohol alcanzado se realizó por medio de cromatografía de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu 2010 con una columna TRB-1 de 30 m de largo y 0.32 mm de diámetro interno. La temperatura de inyección fue de 250 °C con una fase móvil de Helio UAP a una presión de 84,8 kPa y un flujo dentro de la columna de 2.43 mL/min. Con esta disposición se introdujeron las muestras de cada una de las fermentaciones realizadas según el diseño factorial y se obtuvieron los cromatogramas respectivos [19].

#### 4.3.2. pH y Acidez

El pH y la acidez titulable del producto se midió utilizando un pH Mettler Toledo SevenMulti. Para el pH solo el valor reportado al inicio de la prueba y luego para la acidez titulable se diluyó la muestra en 10 mL de agua destilada y se tituló con NaOH hasta llegar a 8.2 de pH [9]. El valor de acidez se obtuvo usando la ecuación 5.

$$AT = \frac{V * M * 75}{10 * v}$$

Donde  $V$  es el volumen de NaOH utilizado,  $M$  es la concentración de la solución de NaOH y  $v$  es el volumen de hidromiel analizado.

### 4.4. Análisis estadístico de los datos

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizó la plataforma Minitab®. Mediante este programa, se evidenció el efecto de cada uno de los factores y sus posibles combinaciones para cada una de las características identificadas del producto final. Por lo tanto, se realizaron tres diseños factoriales.

## 5. Resultados

El estudio se divide en tres partes: el análisis fisicoquímico de la miel, la caracterización del producto final y el diseño factorial propuesto. El análisis de la materia prima se realizó para determinar su calidad y para asegurar que sus propiedades estén dentro de la normatividad correspondiente [12]. Con la respecto al producto final, se realizó un análisis similar para comprobar si las muestras obtenidas cumplían las especificaciones exigidas por la reglamentación [16]. Por último, el diseño factorial se utilizó para identificar los efectos de cada uno de los factores propuestos y sus posibles combinaciones en cada una de las características evaluadas del producto final.

### 5.1. Caracterización fisicoquímica de la miel

Los resultados obtenidos del proceso de caracterización físico-químico de la miel se muestran en la Tabla 2. Con respecto al pH, se obtuvo un valor promedio igual para las dos mieles dentro de los valores especificados en la literatura [11]. Para la miel de Zunuba, se obtuvo un valor de acidez libre por encima del valor máximo permitido por la reglamentación de la OMS [12]. Esto podría llegar a afectar el sabor y a generar efectos no deseados en el metabolismo de las levaduras y su reproducción [11]. Además, una acidez libre alta podría indicar fermentación indeseada de la miel causada por un almacenamiento inadecuado [9]. Por otro lado, la miel de Jardín de las Abejas presenta una menor acidez que se encuentra dentro del rango estipulado, lo que indica almacenamiento correcto.

**Tabla 2.** Características físico-químicas de las mieles estudiadas.

Propiedad	Zunuba	Jardín de las Abejas	Valor Mínimo	Valor Máximo
<b>pH</b>	3,77	3,77	3,4	6,1
<b>Acidez Libre (meq/kg)</b>	56,15	28,7	-	50
<b>Conductividad (<math>\mu</math>S/cm)</b>	536,5	177,9	-	800
<b>Azúcares Reductores (%m/m)</b>	67,76	67,41	60	-
<b>Sólidos Insolubles (%m/m)</b>	0,045%	0,069%	-	0,1
<b>Humedad (%m/m)</b>	20,55	17,88	-	21

Por su parte, la conductividad eléctrica se utiliza principalmente como un indicador de la cantidad de minerales, cenizas y ácidos presentes en la miel [11]. Para el caso de estudio, las dos mieles están dentro del rango de la norma, aunque la miel de Zunuba tiene una mayor concentración de minerales. Esto podría ayudar a la producción de sales minerales que pueden amortiguar el descenso del pH durante la fermentación [9]. La diferencia entre las conductividades de las muestras determina que las mieles son de diferente fuente floral o diferente origen geográfico [11]. Para los azúcares reductores, las dos mieles presentaron niveles de azúcares similares, para la miel de Zunuba las

proporciones fueron de 30.92% de glucosa y 36.84% de fructosa, y para la miel de Jardín de las Abejas fueron de 30.87% de glucosa y 35.77% de fructosa.

Con respecto a la humedad de las muestras, la miel de Zunuba presenta una alta humedad muy cercana al nivel máximo establecido por la reglamentación de la OMS, por otro lado, la miel de Jardín de Abejas obtuvo un valor menor. Teniendo esto en cuenta, la primera miel mencionada podría llegar a presentar fermentación por a su alto porcentaje de humedad. Esto se debe a que, al tener un mayor contenido de agua dentro del sistema, la presencia de levaduras propias de la miel y la concentración alta de sustrato, en este caso azúcares, generan un ambiente propicio para un proceso fermentativo.

## **5.2. Caracterización del producto final**

Para la caracterización del hidromiel, se realizó en las muestras definidas para el diseño factorial. Para las cuatro primeras muestras, se utilizó la miel de Zunuba y las otras se hicieron con miel del Jardín de las Abejas.

### **5.2.1. pH y Acidez**

Los valores obtenidos para cada uno de los parámetros enunciados se muestran en la Tabla 2. Durante la experimentación, una de las muestras se descartó porque se contaminó con el agua de la trampa de aire. Se observó que el pH final para las muestras en donde se utilizó la miel de Jardín de las Abejas es menor al pH obtenido con las muestras donde se usó la miel de Zunuba. Según Schramm, el pH es un parámetro de mucha importancia, debido a que, si se tiene un mosto con un valor bajo de pH, las levaduras podrían llegar a desactivarse y por lo tanto parar la fermentación. El rango normal en donde debería estar el pH es de 3 a 4 [2].

**Tabla 3.** Valores de pH y acidez libre obtenido para cada una de las muestras de hidromiel

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez (g/L)</b>
<b>1</b>	3.34	3.61
<b>2</b>	3.30	3.94
<b>3</b>	3.38	4.54
<b>4</b>	3.48	4,95
<b>5</b>	2.90	3.98
<b>6</b>	2.82	4.95
<b>7</b>	2.94	6.08
<b>8</b>	2.97	5.93

La acidez titulable es muy importante en el sabor del hidromiel y en la preservación del vino, debido a que suprime la actividad de microorganismos [2]. Por lo tanto, si la cantidad de acidez es muy baja o muy alta, es necesario llegar a compensar posteriormente para obtener un producto con la calidad deseada, o se podrían llegar a presentar problemas de crecimiento de microorganismos no deseados [2]. Los valores de todas las muestras están dentro del rango de 3.8 a 8 g/L, definido según la normatividad colombiana [20].

### 5.2.2. Contenido de alcohol

En la reglamentación colombiana, las bebidas alcohólicas fermentadas tipo vino tienen que tener un contenido de alcohol superior al 6% ABV. No obstante, según la literatura especializada en hidromiel, el rango posible se extiende más y tiene subdivisiones [20] [1]. De 3.5% a 7.5% se denomina como hidromel, de 7.5% a 14% standard y de 14% a 18% se le llama sack [1]. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del porcentaje de alcohol en las muestras obtenidos mediante cromatografía de gases.

**Tabla 4.** Contenido de alcohol obtenido para las muestras de hidromiel

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de Alcohol % v/v</b>
<b>1</b>	11,60%
<b>2</b>	12,58%
<b>3</b>	10,60%
<b>4</b>	11,94%
<b>5</b>	8,43%
<b>6</b>	8,40%
<b>7</b>	8,13%
<b>8</b>	9,19%

Se observa que todas las muestras con las diferentes especificaciones del diseño factorial estuvieron por encima del porcentaje de alcohol mínimo según la reglamentación para definirlo como vino. Además, según la clasificación de la BJCP, todas las muestras son hidromiel tipo standard. Con respecto a los resultados obtenidos, las muestras en donde se utilizó la miel de Zunuba tienen una concentración de alcohol mayor, en comparación con las muestras hechas con miel del Jardín de las Abejas. Con relación a los resultados obtenidos con el pH y la acidez se puede determinar que, debido a los bajos niveles de pH y alta acidez obtenida con la miel de Jardín de las Abejas, las levaduras se desactivaron y detuvieron la producción de alcohol. Esto evidencia que para utilizar esta miel para la

producción del hidromiel podría realizarse un control del pH durante la fermentación con la adición de sustancias búfer.

### 5.3. Diseño factorial

Para el análisis del diseño factorial se utilizó el programa de análisis estadístico Minitab®. En éste se ingresaron los resultados obtenidos en la caracterización del producto final para poder identificar si se presentaron efectos que tuvieron los factores manipulados en el diseño. Para todos los diseños, se determinó que el factor tenía un efecto significativo en la variable de respuesta si el p-value asociado era menor al nivel de significancia definido de 5%.

#### 5.3.1. pH

En la Tabla 5, se muestran los p-value obtenidos para el diseño factorial en donde se definió el pH como variable de respuesta. Se observó que la cantidad de nutriente y el tipo de miel, como factores individuales, y la interacción entre la cantidad de nutriente y la relación de agua miel tienen un efecto significativo para el pH. Con respecto a la cantidad de nutriente, se puede determinar que su efecto viene relacionado con la fermentación y sus productos asociados. Esto se debe a que, al tener una mayor cantidad de nutriente, puede llegar a generarse una fermentación indeseada y por lo tanto obtener más subproductos de carácter ácido, como: de ácido acético, alcoholes superiores, etc. [9]. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio específico para determinar la cantidad de nutriente óptimo observando principalmente los ácidos producidos, su concentración en el producto final y el pH asociado con respecto a la cantidad de nutriente agregado.

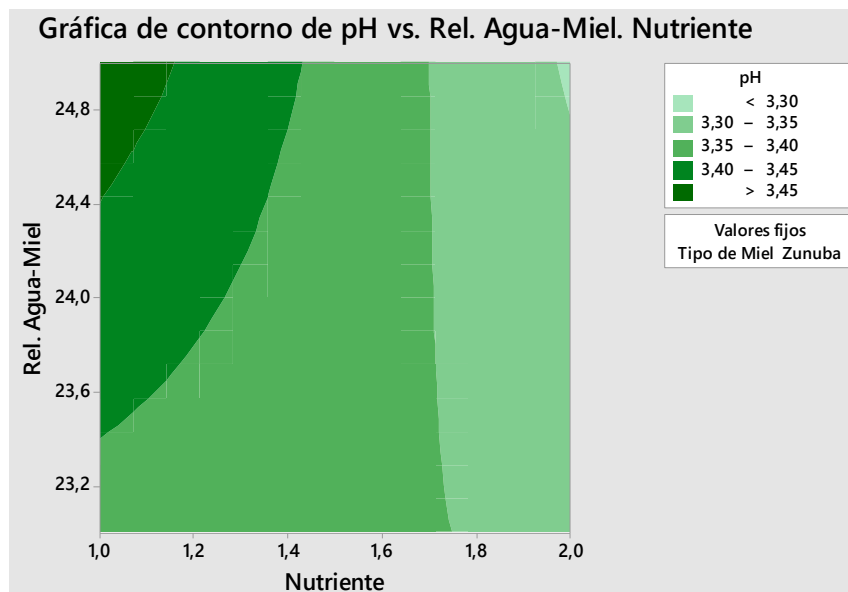
**Tabla 5.** Valores p obtenidos del análisis del diseño factorial con el pH como variable respuesta

<b>Factor</b>	<b>Valor P</b>
<b>Nutriente</b>	0.002
<b>Rel. Agua Miel</b>	1.000
<b>Tipo de Miel</b>	0.000
<b>Nutriente*Rel. Agua Miel</b>	0.025
<b>Nutriente*Tipo de Miel</b>	0.671
<b>Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.260
<b>Nutriente*Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.671

El tipo de miel afecta el pH, porque la cantidad de minerales que ésta tenga puede en la fermentación de sustancias búfer que pueden amortiguar la caída del pH causada por la producción secundaria de ácidos. Esto se ve reflejado en los rangos de pH alcanzados en los productos terminados para cada

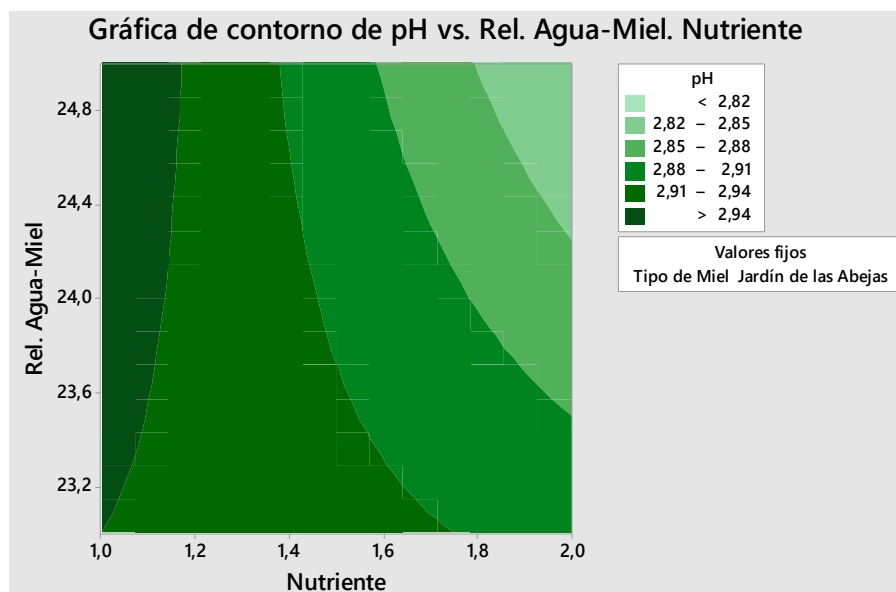
uno de los tipos de miel. Para la miel de Zunuba, la cual tiene una mayor cantidad de minerales, el pH estuvo entre 3.23 y 3.49, y para la miel de Jardín de las Abejas el rango estuvo entre 2.87 y 2.96. Por lo tanto, gracias a la mayor concentración de minerales dentro de la miel de Zunuba, no hubo un cambio tan drástico entre el pH inicial, que para las dos mieles fue de 3.77, y el pH del producto final. Entonces, ya que para la fermentación se busca que no exista una disminución tan grande del pH, es mejor tener una miel con una concentración moderada de minerales, como la miel de Zunuba.

Con respecto a la interacción de la cantidad de nutriente con la relación de agua y miel, o la gravedad específica inicial del mosto, su comportamiento se puede observar de mejor manera en la Figura 2 y la Figura 3. En estas gráficas de contorno se muestra que los valores de pH más adecuados para las dos mieles, que en los dos casos es el valor más alto, se presentan cuando la cantidad de nutrientes es de 1 g/L y la gravedad inicial del mosto es de 25 °Bx. Esto indica que, para mantener un pH adecuado y así asegurar una buena condición en el proceso de fermentación con respecto a este parámetro, es recomendable tener una mayor concentración de azúcares y sólo la cantidad recomendada de nutrientes. Para esta afirmación, se tiene que considerar que, si la concentración de azúcares y de nutrientes son demasiado altas, las levaduras podrían desactivarse por estrés osmótico [9]. Este comportamiento se presenta debido a que el agua dentro de las células, por presión osmótica, se desplaza al medio más concentrado, que en este caso es el mosto, y así desactiva las actividades celulares [9].



**Figura 2.** Gráfica de contorno de pH vs. La interacción entre la relación de agua miel y la cantidad de nutriente para la miel de Zunuba





**Figura 3.** Gráfica de contorno de pH vs. la interacción entre la relación de agua miel y la cantidad de nutriente para la miel de Jardín de las Abejas

### 5.3.2. Acidez titulable

Los valores p obtenidos para este parámetro se muestran en la Tabla 6, de los cuales se puede determinar que sólo hay efectos significativos de la relación de agua miel y el tipo de miel como factores individuales. Con respecto a la relación agua miel, la acidez titulable se puede ver afectada por la cantidad de azúcares disueltos en el mosto, ya que con más azúcares se puede presentar una mayor fermentación y así mismo una mayor producción de ácidos de reacciones secundarias. Con respecto a los resultados de acidez titulable obtenidos en las fermentaciones, se puede observar que para las muestras donde se usó la miel de Zunuba este parámetro se mantuvo relativamente bajo en comparación a los valores obtenidos en las muestras con miel de Jardín de las Abejas. El efecto generado por el tipo de miel se debe a la cantidad de minerales disueltos en cada una de ellas. En la miel de Zunuba se observó una mayor cantidad de minerales, lo cual genera que la acidez del mosto se regule de una manera más adecuada, a diferencia de la miel de Jardín de las Abejas, en donde la baja concentración de minerales no alcanza a moderar el aumento de la acidez.

**Tabla 6.** Valores p obtenidos del análisis del diseño factorial con la acidez titulable como variable de respuesta

Factor	Valor P
Nutriente	0.194
Rel. Agua Miel	0.001
Tipo de Miel	0.002
Nutriente*Rel. Agua Miel	0.428

<b>Nutriente*Tipo de Miel</b>	0.809
<b>Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.385
<b>Nutriente*Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.346

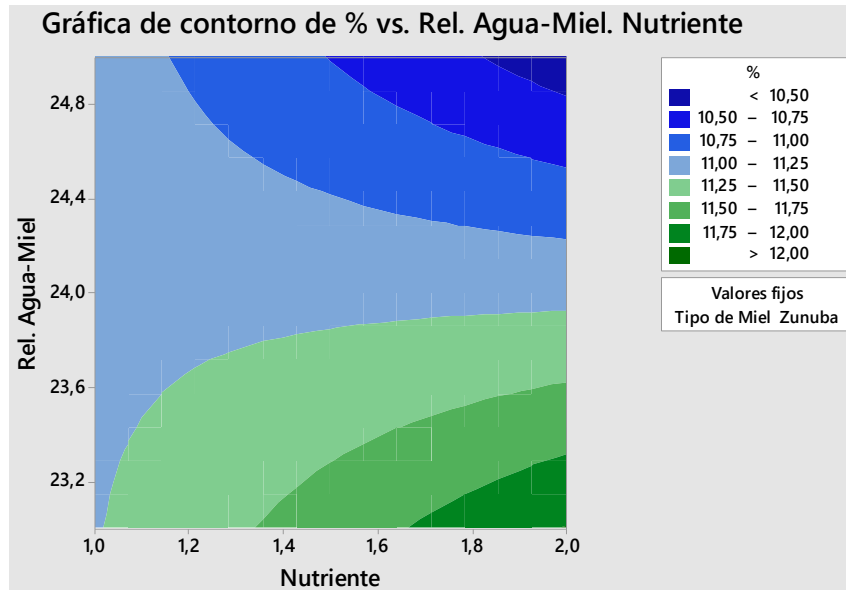
### 5.3.3. Contenido de alcohol

Por último, se realizó el diseño factorial utilizando como variable de respuesta el contenido de alcohol. Los valores p están resumidos en la Tabla 7. En ésta, se puede observar que el tipo de miel como factor individual y la interacción de la relación de agua miel y la cantidad de nutrientes generan un efecto significativo en el contenido de alcohol. Primeramente, el tipo de miel afecta principalmente por el contenido de minerales presentes. Su efecto se debe a la capacidad de amortiguación del pH que tienen los minerales en el proceso [10]. Esto ayuda a que el pH dentro del mosto se mantenga constante y no baje lo suficiente para que se detenga la fermentación.

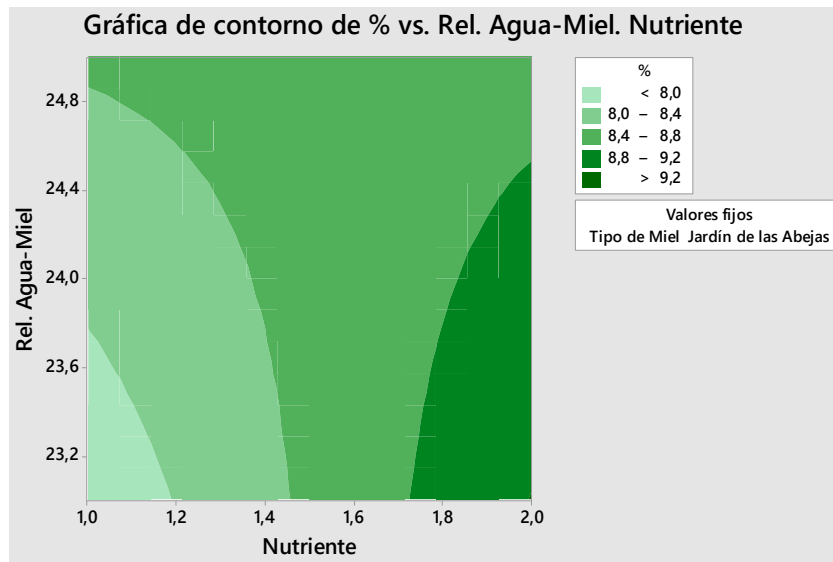
**Tabla 7.** Valores p obtenidos del análisis del diseño factorial con el contenido de alcohol como variable de respuesta

<b>Factor</b>	<b>Valor P</b>
<b>Nutriente</b>	0.176
<b>Rel. Agua Miel</b>	0.220
<b>Tipo de Miel</b>	0.000
<b>Nutriente*Rel. Agua Miel</b>	0.044
<b>Nutriente*Tipo de Miel</b>	0.185
<b>Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.133
<b>Nutriente*Rel. Agua Miel*Tipo de Miel</b>	0.830

Para el análisis de la interacción de la cantidad de nutriente con la relación de miel agua se realizaron graficas de contorno para cada miel mostradas en la Figura 4 y la Figura 5. En estas se puede observar, que para la miel de Zunuba, con una alta relación de agua miel, y alta concentración de nutrientes, se presentan los valores más bajos de producción de alcohol. Esto pudo haber sido provocado por la alta concentración de sustratos en el mosto, la cual generó estrés osmótico en las levaduras, principalmente por la alta cantidad de azúcares más que por la concentración de nutrientes.



**Figura 4.** Gráfica de contorno de contenido de alcohol en % v/v vs. la interacción de la relación de agua miel y la cantidad de nutriente



**Figura 5.** Gráfica de contorno del contenido de alcohol en % v/v vs. la interacción de la relación de agua miel

En contraste de lo ocurrido a bajas concentraciones de azúcar y alta concentración de nutrientes en dónde se presentó el mayor contenido de alcohol. Este comportamiento puede ser derivado por dos razones principalmente: los minerales presentes en la miel, los cuales ayudan a evitar un descenso del pH y aseguran una fermentación activa, y la baja concentración de azúcares, la cual evita que las levaduras presenten estrés osmótico. Por otro lado, previamente se determinó que la concentración de nutrientes dentro del mosto debería ser la definida según la literatura, es decir, 1 g/L o el nivel bajo del factor, para evitar que el pH aumente hasta desactivar la levadura. Sin embargo, las muestras de

mayor contenido de alcohol de la miel de Zunuba tenían una concentración más alta nutrientes. Esto podría deberse a que, aunque el exceso de nutrientes genere una mayor cantidad de ácidos secundarios, como indica la literatura, el pH no disminuye lo suficiente para que la fermentación se detenga, por causa del efecto de amortiguamiento de las sales producidas dentro del mosto. Por lo tanto, la fermentación seguiría y el nivel de alcohol podría aumentar hasta que exista otra condición que haga que las levaduras se desactiven, como un nivel de alcohol muy alto o una producción incontrolable de ácidos que bajen el pH del mosto. Teniendo esto en cuenta, para determinar de forma contundente el efecto del exceso de nutrientes se debe realizar un análisis posterior para determinar las concentraciones finales de nutrientes y ácidos indeseados en el producto final y así argumentar de manera más concisa si los nutrientes en exceso conllevan a características organolépticas y de composición indeseadas al final del proceso [10].

Para la miel de Jardín de las Abejas, mostrado en la Figura 5, el comportamiento del contenido del alcohol fue similar al observado con la miel de Zunuba [9] [10]. No obstante, es necesario aclarar que la fermentación se desactivó, porque con el mismo tiempo de fermentación e iguales condiciones iniciales, el contenido de alcohol más alto alcanzado por las muestras en donde se usó esta miel fue de solo 9,2%, que es inferior al alcanzado por las muestras de la miel de Zunuba. Para esta miel, se puede concluir, al igual que para la otra miel, que a una baja concentración de azúcares y alto nivel de nutrientes se obtuvo la mayor concentración del alcohol. Aunque el valor obtenido de alcohol fue menos de lo esperado, se puede determinar que la alta concentración de nutrientes generó una mayor producción de ácidos secundarios y, debido a la baja concentración de minerales de la miel, no se generaron las sustancias búfer necesarias para evitar que el pH disminuyera y por esto la fermentación se detuvo.

## **6. Conclusiones**

- Se realizó el análisis físico químico de dos tipos de mieles comerciales donde se encontró que una de las mieles, la de Zunuba, no cumplía con la reglamentación establecida sobre la cantidad de acidez libre y sobrepasó el límite estipulado. Aun así, los demás parámetros para las dos mieles estuvieron dentro de los rangos de la reglamentación.
- Las características del producto final se encontraron dentro de la normatividad establecida. Todas las muestras se categorizaron como hidromiel tipo standard, ya que el contenido de alcohol para todas esta entre el rango de 7,5% y 14% v/v.
- Según los análisis factoriales realizados, se pudo observar que el contenido de minerales es muy importante para el proceso, debido al amortiguamiento que tienen estas sustancias aportan al mosto, evitando que el pH descienda lo suficiente y se pare la fermentación.

- Los nutrientes tienen un papel muy importante en la reproducción de las levaduras y ayudan a que el proceso fermentativo se lleve de una manera adecuada, aunque es necesario estudiar más a fondo los efectos del exceso y la producción de sustancias indeseadas que pueden llegar a afectar las características organolépticas del producto.

## 7. Referencias

- [1] Beer Judge Certification Program, «2015 Style Guidelines: Mead Style Guidelines,» BJCP, St. Louis Park, 2015.
- [2] K. Schramm, *The Compleat Meadmaker*, Colorado: Brewers Publications, 2003.
- [3] Portafolio, «Así ha Crecido la Cultura del Vino en Colombia,» 27 Julio 2015. [En línea]. Available: <http://www.portafolio.co/negocios/empresas/crecido-cultura-vino-colombia-39308>.
- [4] Meadist, «Meadist,» 29 April 2014. [En línea]. Available: <http://meadist.com/mead-articles/mead-fastest-growing-segment-us-alcohol-industry/>.
- [5] Agencia de Noticias UN, «El Heraldo,» 28 Marzo 2016. [En línea]. Available: <http://www.elheraldo.co/medio-ambiente/las-abejas-colombianas-se-africanizaron-segun-estudio-de-la-universidad-nacional>.
- [6] O. Alvarez, «Departamento de Ingeniería Química - Universidad de los Andes,» [En línea]. Available: <https://ingquimica.uniandes.edu.co/>. [Último acceso: 21 Septiembre 2016].
- [7] Instituto Nacional de Tecnología Industrial, «Instituto Nacional de Tecnología Industrial,» 21 Septiembre 2016. [En línea]. Available: [http://www.inti.gob.ar/entrerios/pdf/Porque\\_consumir\\_miel.pdf](http://www.inti.gob.ar/entrerios/pdf/Porque_consumir_miel.pdf).
- [8] J. Ulloa, P. Mondragón, R. Rodríguez, J. Reséndiz y M. d. C. Rosas, «La Miel de Abeja y su Importancia,» *Revista Fuente*, pp. 11-18, 2010.
- [9] C. Acosta, «Evaluación de la Fermentación Alcohólica para la Producción de Hidromiel,» Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2012.

- [10] R. Martínez-Moreno, M. Quirós, P. Morales y R. Gonzales, «New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient,» *International Journal of Food Microbiology*, La Rioja, 2014.
- [11] E. Zandamela, «Caracterización Físico-Química y Evaluación Sanitaria de la Miel de Mozambique,» *Universitat Autònoma De Barcelona*, Barcelona, 2008.
- [12] Organización Mundial de la Salud, «Proyecto de Norma Revisado del Codex para la Miel,» *Organización Mundial de la Salud*, Roma, 1999.
- [13] G. Salazar, «Estudio de la Influencia de Tres Variedades de Levaduras Vínicas y Levadura de Panificación en la Calidad Sensorial del Vino de Manzana, Variedad Emilia,» *Universidad Técnica de Ambato*, Ambato, 2010.
- [14] Springer Oenologie, «Springer Oenologie,» Julio 2013. [En línea]. Available: <http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2010/07/FT-VR-44-EN.pdf>.
- [15] C. Contreras y M. C. Campo, «Productos De La Fermentación Alcohólica: Un Beneficio para la Salud,» *Universidad de San Buenaventura*, Cartagena, 2014.
- [16] Ministerio de Salud y Protección Social, «Decreto 1686 de 2012,» *Ministerio de Salud y Protección Social*, Bogotá, 2012.
- [17] International Honey Commision, «Harmonised Methods of the International Honey Commision,» *International Honey Commision*, 1999.
- [18] P. Contreras, «Comparación del Método HPLC y el Método de Infrarrojos para la Determinación de Azúcares en la Miel,» *Universidad de la Rioja*, La Rioja, 2014.
- [19] ICONTEC, «Cerveza. Métodos para Determinar el Contenido de Alcohol Etílico en Cerveza,» *ICONTEC*, Bogotá, 1996.
- [20] ICONTEC, NTC 1244: Bebidas alcohólicas Vino de mesa, Bogotá: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 2001.
- [21] R. Gayre y C. Papazian, *Brewing Mead: Wassail!* In *Mazer of Mead*, Boulder: Brewers Publications, 1986.

