

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD RAFAEL URDANETA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA



**EFFECTO DE LA L-ARGININA SOBRE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN  
ALCOHÓLICA DE LA MIEL DE ABEJA**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la  
Universidad Rafael Urdaneta para optar al título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

Autores: Br. GIANPAOLO IOVINO

Br. ANA MUÑOZ

Tutor: Ing. María Da Costa, M.Sc

Co-Tutor: Ing. Douglas Romero, M.Sc

Maracaibo, septiembre de 2019

**EFFECTO DE LA L-ARGININA SOBRE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN  
ALCOHÓLICA DE LA MIEL DE ABEJA**

DERECHOS RESERVADOS

---

Iovino Salas, Gianpaolo Andrés

C.I.: 25.709.929

Av. 3F, Maracaibo, Zulia

Telf.: +58 (424) 623-0593

giovino18@gmail.com

---

Muñoz López, Ana Daniela

C.I.: 27.264.077

Av. Milagro Norte, Maracaibo, Zulia

Telf.: +58 (412) 668-3840

ana\_dani98@hotmail.com

---

Ing. Da Costa, María, M.Sc

Tutor académico

---

Ing. Romero, Douglas, M.Sc

Co-Tutor académico

## DEDICATORIA

A mis padres, Gianfranco Iovino y Claudia Salas, y a mi hermana, Giulia Iovino; por ser ellos mis principales consejeros de vida, y por el apoyo que me brindaron en todo momento para poder superar todas las dificultades presentadas, tanto en el ámbito personal, como en el universitario.

A mi tío Felice Iovino, por ser una parte importante de mi vida, siendo él una gran influencia en ella; por sus consejos y por proveerme las herramientas necesarias para cumplir mis metas.

A mi compañera de tesis, Ana Muñoz, por convertirse en un apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida, y por su sincera amistad.

A mis profesores y tutores, porque a través de sus enseñanzas logré superar los obstáculos presentados durante este trayecto, para poder cumplir esta meta.

Gianpaolo Andrés Iovino Salas

## DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mis padres, Esneiro Muñoz y Omaira López, y a mi hermana, Ana Muñoz; por su cariño y apoyo incondicional, sin ustedes nada de esto hubiese sido posible; por escucharme y aconsejarme en cada dificultad presentada durante la carrera; por siempre motivarme a ser la mejor versión de mí. Este logro es por y para ustedes, de esta forma les correspondo, en pequeña parte, todo lo que han hecho por mí durante estos años de formación universitaria.

A mi amigo y compañero de tesis, Gianpaolo Iovino, porque este logro es sólo el inicio de muchas cosas para ambos, y por hacer este trayecto más llevadero y bonito.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación universitaria, por su dedicación, tiempo y apoyo, para poder hacer de esta meta una realidad.

A todos los entusiastas en fermentación alcohólica y amantes de la ciencia, para que con sus trabajos e investigaciones promuevan un país, e incluso, un mundo mejor; para que sigan innovando y ofreciendo soluciones para determinados problemas.

Ana Daniela Muñoz López

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por proveernos la salud, sabiduría y paciencia necesarias para llevar a cabo el presente trabajo especial de grado; y por proveerles a nuestros padres, los recursos necesarios que hicieron posible nuestra formación académica.

A la Universidad Rafael Urdaneta, por la facilitación de las instalaciones del laboratorio de Química General para llevar a cabo los objetivos planteados; por los excelentes profesores que nos formaron tanto en el ámbito profesional, como en el humano; por ser la casa de estudio que nos abrió sus puertas y que nos permitió desarrollar nuestras destrezas y habilidades.

Al tutor y co-tutor académicos, Ing. María Da Costa e Ing. Douglas Romero, respectivamente, por su presencia, apoyo y colaboración durante tantas horas; por permitirnos representarlos como tutores y, a nosotros, como sus tesistas.

Al señor Sandro D'Amico, por su constante disposición de ayuda hacia nosotros, en cuanto a fermentación alcohólica se refiere; por facilitarnos los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo los experimentos; y por creer en nuestro trabajo, al que prestó la mayor colaboración posible.

A la empresa INDESCA (Investigación y Desarrollo, C.A.), por permitirnos utilizar sus instalaciones para llevar a cabo las respectivas pruebas sensoriales; y a todos sus trabajadores, por su disposición de degustar y evaluar los hidromieles.

Por último, gracias a todas aquellas personas que de forma directa o indirecta hicieron este logro posible.

Gianpaolo A. Iovino Salas, Ana D. Muñoz López

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	17
1.1. Planteamiento del problema.....	17
1.2. Objetivos de la investigación.....	21
1.2.1. Objetivo general.....	21
1.2.2. Objetivos específicos.....	21
1.3. Justificación de la investigación.....	22
1.4. Delimitación de la investigación.....	23
1.4.1. Delimitación especial.....	23
1.4.2. Delimitación temporal.....	24
1.4.3. Delimitación científica.....	24
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	25
2.1. Antecedentes de la investigación.....	25
2.2. Bases teóricas.....	28
2.2.1. Bebidas alcohólicas.....	28
2.2.2. Fermentación alcohólica.....	28
2.2.2.1. Conceptos básicos sobre fermentación alcohólica.....	29
2.2.2.2. Procesos químicos en la fermentación alcohólica.....	29
2.2.3. Miel de abeja.....	33
2.2.3.1. Miel de abeja como sustrato de fermentación.....	34

2.2.3.2. Caracterización de la miel de abeja.....	34
2.2.4. Hidromiel.....	42
2.2.4.1. Consideraciones en la producción de hidromiel.....	44
2.2.4.2. Aspectos fisicoquímicos.....	57
2.2.4.3. Panorama general.....	59
2.2.5. Aroma del hidromiel.....	61
2.2.5.1. Derivados volátiles de la miel.....	61
2.2.5.2. Derivados volátiles de la levadura.....	62
2.2.6. Variedades de hidromiel.....	65
2.2.6.1. Melomel.....	65
2.2.6.2. Cyser.....	66
2.2.6.3. Pymment.....	66
2.2.6.4. Metheglin.....	66
2.2.6.5. Braggot o bracket.....	66
2.2.6.6. Rodomel.....	66
2.2.7. Evaluación sensorial del hidromiel.....	67
2.2.8. Productos derivados del hidromiel.....	68
2.3. Sistema de variables.....	69
2.3.1. Definición nominal.....	69
2.3.2. Definición conceptual.....	69
2.3.2.1. L-arginina.....	69
2.3.2.2. Fermentación alcohólica.....	70
2.3.2.3. Miel de abeja.....	70
2.3.2.4. Hidromiel.....	70
2.3.3. Definición operacional.....	71
2.3.4. Operacionalización de las variables.....	72
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	73
3.1. Tipo de investigación.....	73

3.2. Diseño de la investigación.....	75
3.2.1. Diseño no experimental.....	76
3.2.2. Diseño de campo.....	77
3.2.3. Diseño documental.....	78
3.2.4. Diseño experimental.....	79
3.2.5. Diseño cuantitativo.....	80
3.3. Técnicas de recolección de datos.....	81
3.3.1. Observación directa.....	82
3.3.2. Interacción personal.....	83
3.4. Instrumentos de recolección de datos.....	84
3.4.1. Determinación de la densidad de la miel de abeja.....	85
3.4.2. Determinación del pH de la miel de abeja.....	86
3.4.3. Determinación del índice de refracción de la miel de abeja.....	87
3.4.4. Determinación de los grados Brix de la miel de abeja.....	87
3.4.5. Seguimiento de los grados Brix.....	88
3.4.6. Seguimiento de la densidad.....	89
3.4.7. Comparación sensorial de los hidromieles.....	90
3.5. Población y muestra.....	90
3.5.1. Población.....	90
3.5.2. Muestra.....	91
3.6. Fases de la investigación.....	94
3.6.1. Fase I: Caracterización fisicoquímica de la miel de abeja.....	94
3.6.1.1. Determinación de la densidad.....	94
3.6.1.2. Determinación del pH.....	95
3.6.1.3. Determinación del índice de refracción.....	96
3.6.1.4. Determinación de los grados Brix.....	97
3.6.2. Fase II: Establecimiento de las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación.....	97
3.6.3. Fase III: Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de	

abeja.....	98
3.6.3.1. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características fisicoquímicas de los productos resultantes, en función del tiempo.....	107
3.6.3.2. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, comparando con el obtenido sin la adición de la fuente nitrogenada (tiempo fermentativo estándar).....	108
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	110
4.1. Caracterizar fisicoquímicamente la miel de abeja.....	110
4.1.1. Determinación de la densidad.....	110
4.1.2. Determinación del pH.....	112
4.1.3. Determinación del índice de refracción.....	113
4.1.4. Determinación de los grados Brix.....	114
4.2. Establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación.....	116
4.2.1. Determinación de la proporción miel/agua.....	116
4.2.2. Determinación de la cantidad de levadura.....	116
4.2.3. Determinación de la cantidad de L-arginina.....	117
4.3. Determinar el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de la fermentación alcohólica de la miel de abeja.....	117
4.3.1. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características fisicoquímicas de los productos resultantes, en función del tiempo.....	118
4.3.1.1. Seguimiento de los grados Brix.....	118
4.3.1.2. Seguimiento de la densidad.....	120
4.3.1.3. Determinación del grado alcohólico.....	124
4.3.2. Determinación del efecto de la L-arginina sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación,	

comparando con el obtenido sin la adición de la fuente nitrogenada (tiempo fermentativo estándar).....	125
CONCLUSIONES.....	132
RECOMENDACIONES.....	133
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
ANEXOS.....	150
APÉNDICES.....	160

DERECHOS RESERVADOS

## ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 3.1. Datos para la determinación de las masas de miel de abeja.....	86
Tabla 3.2. pH de la miel de abeja.....	86
Tabla 3.3. Índice de refracción de la miel de abeja.....	87
Tabla 3.4. Grados Brix de la miel de abeja.....	87
Tabla 3.5. Grados Brix de los mostos e hidromieles.....	88
Tabla 3.6. Densidades de los mostos e hidromieles.....	89
Tabla 4.1. Datos para la determinación de las masas de miel de abeja.....	110
Tabla 4.2. Masas de miel de abeja.....	111
Tabla 4.3. Densidad de la miel de abeja.....	112
Tabla 4.4. pH de la miel de abeja.....	113
Tabla 4.5. Índice de refracción de la miel de abeja.....	114
Tabla 4.6. Grados Brix de la miel de abeja.....	115
Tabla 4.7. Grados Brix de los mostos e hidromieles.....	118
Tabla 4.8. Densidades de los mostos e hidromieles.....	121
Tabla 4.9. Promedios aritméticos y modas para los hidromieles A y C, de manera general.....	126
Tabla 4.10. Promedios aritméticos y modas para los hidromieles A y C, del sexo masculino.....	129
Tabla 4.11. Promedio aritméticos y modas para los hidromieles A y C, del sexo femenino.....	130

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 2.1. Sistema de reacciones en la glucólisis. (Nielsen et al., 2003).....	31
Figura 2.2. Metabolismo fermentativo en las levaduras. (Nielsen et al., 2003).....	32
Figura 2.3. Metabolismo fermentativo mixto. (Nielsen et al., 2003).....	32
Figura 2.4. Producción de hidromiel. (Pereira, Oliveira, Mendes-Ferreira, Estevinho y Mendes-Faia, 2017).....	50
Figura 4.1. Cambio de °Bx de los mostos, durante la fermentación.....	119
Figura 4.2. Cambio de la densidad de los mostos, durante la fermentación.....	122
Figura 4.3. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al color.....	127
Figura 4.4. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al aroma.....	128
Figura 4.5. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al sabor.....	129

Iovino Salas, Gianpaolo Andrés; Muñoz López, Ana Daniela. **EFFECTO DE LA L-ARGININA SOBRE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LA MIEL DE ABEJA.** Trabajo Especial de Grado para optar al título de: Ingeniero Químico. Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Zulia, Venezuela (2019). 162p.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito determinar el efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, es decir, en la producción de hidromiel mediante una investigación descriptiva y a través de los diseños: de campo, documental, experimental y cuantitativo. Se caracterizó fisicoquímicamente la miel, determinando su densidad, pH, índice de refracción y grados Brix. Posteriormente, se establecieron las proporciones de los componentes (agua, miel, levadura y L-arginina) de los sustratos de fermentación. Se establecieron las condiciones iniciales de operación para la producción artesanal de tres hidromieles, a partir de diluciones miel/agua de 28 °Bx, dos de ellas con adición de L-arginina (B: 1.05 g y C: 2.10 g, respectivamente). Las fermentaciones fueron realizadas entre 20 y 25 °C, utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante el seguimiento de °Bx y densidad de los mostos, se determinó el tiempo de fermentación. Se compararon sensorialmente los dos hidromieles cuyos tiempos fueron el menor (C) y el mayor (A), respectivamente, mediante una prueba con 30 personas. La caracterización fisicoquímica de la miel arrojó valores promedios de: densidad, 1.43 g/mL; pH, 3.78; índice de refracción, 1.49; y, grados Brix, 80.00°, comprobando así su pureza. El tiempo de fermentación para el hidromiel A fue de: 27 días, para el B: 21 días y para el C: 12 días. Se comprobó que, la L-arginina ejerció un efecto significativo en la reducción del tiempo de fermentación, ya que, los dos mostos con adición del aminoácido (B y C), correspondieron a los de mejor avance fermentativo, especialmente el contenido de 2.10 g de L-arginina (C); además, esta fuente nitrogenada no influyó negativamente sobre las características sensoriales (color, aroma y sabor) del hidromiel C, en comparación con el A (0 g de L-arginina), cuyo tiempo fermentativo fue el estándar.

Palabras claves: miel, hidromiel, fermentación alcohólica, nitrógeno, L-arginina.

Correos electrónicos: giovino18@gmail.com / ana\_dani98@hotmail.com

Iovino Salas, Gianpaolo Andrés; Muñoz López, Ana Daniela. **EFFECT OF L-ARGININE ON THE ALCOHOLIC FERMENTATION PROCESS OF HONEY BEE**. Special Degree Work for the title of: Chemical Engineer. Universidad Rafael Urdaneta. Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Maracaibo, Zulia, Venezuela (2019). 162p.

## ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the effect of the addition of L-arginine on the alcoholic fermentation process of honey bee (that is, in the production of mead, through a descriptive research and through the designs: field, documentary, experimental and quantitative). The honey was characterized physicochemically, by determining its density, pH, refractive index and Brix degrees. Subsequently, the proportions of the components (water, honey, yeast and L-arginine) of the fermentation substrates were established. The initial conditions of operation for the artisanal production of three meads were established, from honey/water dilutions of 28 °Bx, two of them with addition of L-arginine (B: 1.05 g and C: 2.10 g, respectively). The fermentations were carried out between 20 and 25 °C, using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Through the follow-up of °Bx and the density of the musts, the fermentation time was determined. The two meads whose times were the lowest (C) and the highest (A), respectively, were sensory compared by a test with 30 people. The physicochemical characterization of the honey showed average values of: density, 1.43 g/mL; pH, 3.78; refractive index, 1.49; and, Brix degrees, 80.00°, thus proving its purity. The fermentation time for mead A was: 27 days, for B: 21 days and for C: 12 days. It was proved that, L-arginine exerted a significant effect in the reduction of the fermentation time, since the two musts with addition of this amino acid (B and C), corresponded to those of better fermentation advance, especially the must contained of 2.10 g of L-arginine (C). In addition, this nitrogen source didn't negatively influence the sensory characteristics (color, aroma and taste) of the mead C, compared to A (0 g of L-arginine), whose fermentation time was the standard.

Keywords: honey, mead, alcoholic fermentation, nitrogen, L-arginine.

Emails: giovino18@gmail.com / ana\_dani98@hotmail.com

## INTRODUCCIÓN

El sector agroindustrial de un país requiere el aprovechamiento eficaz de los recursos con los que cuenta; en la actualidad, la apicultura en Venezuela ha incursionado paulatinamente, debido al potencial de sus productos y la importancia que el adecuado mantenimiento de la polinización representa para el sector agrícola del país, lo cual ha impulsado el desarrollo de investigaciones centradas en productos agrícolas, específicamente en el sector apícola, donde la miel extraída está compuesta por carbohidratos (principalmente fructosa y glucosa), vitaminas, minerales y trazas de aminoácidos.

Sin embargo, a pesar de que la producción es de calidad y cantidad, el consumo de miel en el país sigue siendo muy bajo, debido principalmente a la desinformación sobre las propiedades de esta sustancia, ya que esta es empleada principalmente en remedios caseros y, en pocos casos, para endulzar alimentos, ignorando su versatilidad.

Se conoce como hidromiel a la bebida fermentada a partir de miel, agua y levaduras, reportada como una de las más antiguas, anterior al vino y, probablemente, precursora de la cerveza, cuyo consumo estuvo muy difundido entre los pueblos de la antigüedad. En la actualidad, el hidromiel es elaborado a escala industrial con gran aceptación y demanda en algunos países del mundo; cabe destacar que, en Venezuela esta bebida se elabora, vagamente, de manera artesanal, destinándose casi exclusivamente al consumo familiar.

La producción de hidromiel es un proceso que suele tomar bastante tiempo, debido a la cantidad de azúcares presentes en la miel y por la deficiencia de nitrógeno en el medio fermentativo, del cual las levaduras (silvestres o comerciales) se nutren para poder transformar los azúcares en etanol.

Con base en lo expuesto, se ha seleccionado la L-arginina (aminoácido) como fuente nitrogenada del proceso, ya que esta es precursora del óxido nítrico, y por ende, del nitrógeno que las levaduras necesitan para poder reproducirse rápidamente. Por lo que, en este trabajo de grado, se propone como objetivo determinar el efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja; y como parte de esta propuesta, se hace necesario el cumplimiento de tres objetivos específicos, para poder dar respuesta a este vacío de conocimiento.

De ser considerado el hidromiel con adición de L-arginina (cuyo tiempo de fermentación sea el menor) como un producto de buena calidad, en comparación con aquel cuyo tiempo fermentativo sea el estándar, mediante la muestra tomada de la población, se ofrecería una solución para entusiastas en fermentación que quisieran reducir el tiempo de producción; además, se incentivaría al sector apícola del país y, consecuentemente, a los apicultores, de lo cual resultaría un aporte metodológico, económico, social y cultural a Venezuela.

El presente trabajo especial de grado, se encuentra estructurado en cuatro capítulos. En el primero, se destaca la problemática a tratar, los objetivos de la investigación, la justificación y las delimitaciones. En el segundo capítulo, se describen los antecedentes de la investigación (bases metodológicas); de igual forma, se presenta el soporte teórico (bases teóricas) y el sistema de variables.

El tercer capítulo contempla el tipo y diseño de la investigación, las técnicas e instrumentos de recolección de datos y las fases de la investigación, donde se describe detalladamente la metodología utilizada para llevar a cabo los objetivos específicos planteados. Por último, el cuarto capítulo exhibe los análisis de los resultados obtenidos en la realización de las fases, con la finalidad de dar respuesta a la hipótesis de la investigación. Adicionalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

Este capítulo presenta el enfoque metodológico del trabajo de investigación, en donde se describen los elementos que dan origen al mismo. En este sentido, se describe el planteamiento del problema, el objetivo general, los objetivos específicos, la justificación de la investigación, la delimitación espacial, temporal y científica. Tales elementos constituyen el fundamento para el desarrollo de la investigación.

DERECHOS RESERVADOS

#### **1.1. Planteamiento del problema**

La miel es un alimento que ha estado disponible a través de toda la historia de la evolución humana, ya que es obtenida de manera natural. Es un producto rico en fructosa, por lo que es considerada, a veces, un alimento poco saludable, sin embargo, también es rica en antioxidantes y otras propiedades que la hacen más saludable que el azúcar, las cuales no deberían ser ignoradas tan fácilmente ante la mera mención de la fructosa contenida. (Olivares, 2015).

Según la Fundación para el Desarrollo Apícola (Fundapi, 2015), se conoce que los principales estados productores de miel se encuentran en Monagas, Cojedes, Yaracuy, Carabobo y Lara. Pero un 80 % de la miel se obtiene en las sabanas del estado Monagas. Cada colmena de un apicultor promedio, en Venezuela, produce anualmente 40 kg de miel, aunque en el Oriente dicha producción puede llegar hasta 100 kg.

Sin embargo, la amplia distribución de miel industrial y la baja cultura de consumo, representan grandes inconvenientes para el avance de este sector, siendo la miel

un producto poco demandado por el consumidor venezolano, la cual, no responde a la ley de oferta y demanda en cuanto a calidad y precio.

El consumo local de miel es muy bajo considerando la miel importada y la producción nacional de los apicultores, calculándose un consumo de 35 gramos/persona/año. Adicionalmente, es uno de los productos agrícolas que no tiene precio establecido por el Estado. (Ministerio de Agricultura y Tierras, 2002).

A pesar de que el consumo de miel tiene cierta estacionalidad, con preponderancia en el período diciembre-abril, influenciado por las fiestas navideñas y la Semana Santa, sumado al hecho de ser la época de mayor cosecha, lamentablemente, sobre la miel existe gran desinformación.

En Venezuela, la miel es usada principalmente, para preparar remedios caseros contra la gripe y resfriados en forma de tés o infusiones, de allí que el consumo per-cápita sea tan bajo. Por lo que, para mejorar la percepción y comercialización, se requiere que los expendedores de este producto realicen una publicidad adecuada, donde se expliquen las ventajas y bondades de la miel, entre las cuales se encuentra la fermentación alcohólica de este producto. Además, Venezuela cuenta con variedad y calidad, que vale la pena explorar por su gran versatilidad.

Debido a que la miel permite la captación de mercados emergentes, que a través de tratamientos de conservación y transformación generan nuevos productos dando valor agregado y mejorando la rentabilidad de la cadena apícola, asimismo ha conllevado a explorar nuevas bebidas, obtenidas de fuentes alternas a la uva, donde el enfoque principal está en el aprovechamiento de las propiedades funcionales de otros compuestos naturales.

Al mismo tiempo, dicho enfoque impulsará el desarrollo de investigaciones centradas en productos agrícolas de interés que marquen una diferencia

significativa en el mercado, donde el sector apícola tiene un gran potencial que no se ha estudiado a profundidad.

El proceso de fermentación alcohólica es tan antiguo como la humanidad, y es importante resaltar que, los fermentos varían según el clima, la temperatura del lugar dónde se fermenta, la estación del año en que se está fermentando y los distintos ingredientes que se usan. (Baudar, 2018).

Blanco, Quicazán y Cuenca (2012), establecen que “el hidromiel es una bebida alcohólica tradicional derivada de la miel que contiene entre 6 y 18 % de alcohol en volumen, y se obtiene mediante fermentación alcohólica por levaduras de miel diluida.” (p.1).

Asimismo, conocido como el fermento más antiguo, el hidromiel variará según la composición microbiana de los ingredientes y del ambiente inmediato en que se encuentra.

Esta bebida alcohólica a base de miel, presenta ventajas sobre otros tipos de alcoholes como son la cerveza y el vino, por la sencillez de su elaboración, ya que no se necesitan numerosos instrumentos o equipos para la fermentación; no se necesita descomponer carbohidratos en azúcares simples para que la levadura pueda ingerir dicho azúcar simple y convertirlo en alcohol, como es debido realizar en el caso de la cerveza; y el uso de frutas es opcional, a diferencia de la elaboración de vino.

El hidromiel es tradicional en el consumo euroasiático y actualmente despierta gran interés en las agroindustrias, ya que, representa una potencial salida comercial para la cadena apícola. Según la Fundación para la Innovación Agraria (2008), esta bebida representa en Europa Occidental un 10 % del consumo de bebidas tipo vino y un 30 % en el consumo de Europa.

En Latinoamérica, no tiene mayor reconocimiento o distribución, sin embargo, estudios chilenos han demostrado el potencial de esta bebida dentro del mercado de exportación de las bebidas alcohólicas tipo vino. (Valdebenito et al., 2006).

En cuanto a la producción de hidromiel, es un proceso que consume mucho tiempo debido al bajo contenido de nitrógeno de la miel. (Blanco et al., 2012).

Henschke et al. (2011), establecen que “el contenido de nitrógeno de la miel es aproximadamente de 0,04 %, lo cual limita la capacidad de formación de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor y aroma del hidromiel.” (p.1).

Según Baudar (2018), en la fermentación alcohólica de la miel es necesario emplear una fuente de levadura, la cual, además de necesitar azúcar, necesita nutrientes (sean de una fuente natural o comercial), de lo contrario, las levaduras pueden estresarse y agotarse antes de terminar de cumplir su función.

En el caso de la levadura comercial, sus nutrientes pueden ser: los ácidos, no tanto como nutrientes sino para balancear el sabor y la acidez del hidromiel; y el nitrógeno, el cual ayuda a la levadura a producir más enzimas y, consecuentemente, a reproducirse más rápido.

La L-arginina, un aminoácido con importantes funciones fisiológicas, favorece la síntesis de óxido nítrico, y por ende, se asume como un precursor de nitrógeno. Es una molécula producida en muchos tejidos a partir de la L-arginina, la cual se encuentra en altas concentraciones en el endotelio, en donde el óxido nítrico funciona como agente antiaterogénico y antiagregante plaquetario. (Duarte, Espinosa, Díaz y Sánchez, 2008).

La L-arginina no provoca poblaciones elevadas de levaduras, lo cual es un efecto beneficioso para la fermentación alcohólica, ya que, poblaciones numerosas

necesitan mayor cantidad de nutrientes (vitaminas, minerales, ácidos grasos y nitrógeno), cuya demanda es difícil de mantener hasta el agotamiento de los azúcares. (Navascués, 2014).

Actualmente, no se conoce el efecto de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica, por esta razón y en lo que pretende ser la base de trabajos futuros enfocados en el desarrollo de productos apícolas procesados que puedan ser incluidos en nuevos mercados de distribución, como son las bebidas alcohólicas o la industria alimenticia, esta investigación tiene como propósito dar respuesta a la siguiente interrogante, ¿Qué efectos tiene la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja?.

## **1.2. Objetivos de la investigación**

Para alcanzar el propósito de este trabajo de investigación, se proyectó un objetivo general con los respectivos objetivos específicos, los cuales hacen referencia a las metas que se alcanzarán en la investigación.

### **1.2.1. Objetivo general**

Determinar el efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja (producción de hidromiel).

### **1.2.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar fisicoquímicamente la miel de abeja.
2. Establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación.

3. Determinar el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja.

### **1.3. Justificación de la investigación**

Con el propósito de generar una propuesta viable que aporte al conocimiento, y a la vez suministrar información de validez que sirva de base o complemento para futuros proyectos de investigación, mediante este trabajo se propone determinar el efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, ya que no existen antecedentes relacionados con el tema.

El sector apícola posee un rol fundamental en la economía del país, ya que contribuye al desarrollo socioeconómico al vincularse con otras actividades productivas. Sin embargo, el consumo de miel de abeja continúa siendo muy bajo, al mismo tiempo que la producción de bebidas alcohólicas está emergiendo.

El motivo principal para la realización de este trabajo de investigación, se debe a las numerosas propiedades que posee la miel; por lo que, se pretende seguir ofreciendo alternativas para el consumo de la misma.

Asimismo, la fermentación alcohólica de la miel incentivará a los apicultores a permanecer con la extracción, al presentarse esta nueva opción de comercialización para su producto; y constituirá una propuesta para la industrialización del hidromiel, al variar la dosificación de L-arginina para fines prácticos, ya sea para la construcción de una planta piloto, y/o como posibilidad novedosa que daría respuesta a la gran demanda en el mercado, especialmente, para diversos actos sociales, ya sean culturales, políticos, familiares, entre otros.

Además, esta investigación aportará una solución para expertos o entusiastas en fermentación, que deseen producir hidromiel en un período de tiempo reducido,

mediante la proporción adecuada de L-arginina. Al mismo tiempo, se desea motivar a las personas interesadas en el tema a emplear otras fuentes nitrogenadas, y así, continuar ofreciendo diversas opciones para la reducción del tiempo de fermentación.

Por otro lado, durante la realización del presente trabajo especial de grado, se desarrollará una nueva metodología para llevar a cabo evaluaciones sensoriales de productos, ya que, se implementará un test de preferencia compuesto por un formato de evaluación sensorial de carácter comparativo; el cual, constituirá la base para futuras investigaciones que requieran la comparación de determinados productos.

#### **1.4. Delimitación de la investigación**

En este apartado, se delimita el proyecto para atribuirle un enfoque concreto de alcances, límites y las áreas del saber que abarcará, con la finalidad de facilitar el manejo de una situación compleja y extensa.

##### **1.4.1. Delimitación espacial**

El presente trabajo especial de grado se desarrolló en dos localidades: el Laboratorio de Química General de la Universidad Rafael Urdaneta (URU), ubicada en la Vereda del Lago, Avenida 2 “El Milagro”, el cual cuenta con los materiales y equipos necesarios para llevar a cabo los dos primeros objetivos específicos de la investigación.

En cuanto al tercero, se desarrolló de manera artesanal en Montecelo, residencia situada en la Avenida 3F con calle 67 “Cecilio Acosta”, la cual cuenta con la infraestructura y los materiales necesarios para el cumplimiento de este último

objetivo específico. Ambos lugares de trabajo se encuentran ubicados en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

#### **1.4.2. Delimitación temporal**

Este trabajo de investigación se desarrolló en un período de tiempo de ocho (8) meses, comprendidos desde enero hasta septiembre del año 2019, lográndose en este lapso los objetivos planteados.

#### **1.4.3. Delimitación científica**

El presente trabajo de investigación se encuentra enmarcado en el área de Ingeniería Química y se requirieron conocimientos de: química general, fisicoquímica y tecnología de los alimentos.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

Este capítulo contiene los antecedentes y bases teóricas que sustentan el desarrollo de la investigación, teniendo en cuenta cada uno de los aspectos necesarios para la ejecución de cada una de las fases que constituyen la investigación. Asimismo, se definen los conceptos básicos y se describen las variables a utilizar en este estudio.

DERECHOS RESERVADOS

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

En la revisión bibliográfica y documental realizada, se encontraron diferentes estudios que hacen referencia a la fermentación alcohólica de la miel, al efecto de la adición de fuentes nitrogenadas y a las generalidades de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales sirven de base para el estudio y el desarrollo de los objetivos específicos del presente trabajo especial de grado. Entre estas investigaciones están las siguientes:

- Cheng, Du, Zhu, Guo y He (2016). Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. Artículo publicado en la revista Scientific Reports, 10/08/2016, p. 1 - 12. CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China.

Este trabajo de investigación consistió en evaluar la relación entre la arginina y la respuesta de la levadura al estrés por etanol, a partir de la construcción de cepas de levadura con diferentes niveles de contenido de arginina, donde se observaron

marcadas inhibiciones del etanol en el crecimiento celular, la expresión de genes implicados en la biosíntesis de arginina y la acumulación intracelular de esta. Se concluyó que, la adición extracelular de arginina disminuye el daño producido por el etanol a la levadura, en gran medida.

Las investigaciones realizadas en este trabajo aportaron información, tanto conceptual como experimental, sobre el hecho de que la L-arginina mantiene la integridad de la pared celular y la membrana del citoplasma, estabilizando la morfología y la función de las organelas, protegiendo así las células de levadura que sufren daños por el etanol presente en el medio fermentativo.

- Blanco, Quicazán y Cuenca (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. Artículo publicado en la revista Vitae, vol. 19, No. 1, 10/01/2012, p. 234 - 236. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Evaluaron el sulfato de amonio, fosfato diácido de amonio, extracto de levadura y polen en las fermentaciones a 25 °C empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo, se concluyó que el tiempo de fermentación se redujo en los mostos con adiciones de sulfato de amonio y extracto de levadura, en comparación con el mosto sin adición de fuentes de nitrógeno.

El presente trabajo especial de grado, se fundamentó en las conclusiones de este artículo, ya que el mismo aportó, a través de un enfoque conceptual y experimental, conocimientos sobre el empleo de diversas fuentes nitrogenadas y el efecto que estas ejercen en la reducción del tiempo de la fermentación etanólica de la miel de abeja. Debido a esto, el incentivo de elaborar mostos con la adición de una fuente de nitrógeno.

- Howell (2011). Yeast nutrition and successful fermentations. Artículo publicado en la revista Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker,

número 573, p. 101 - 102. Vintessential Laboratories, Universidad de Australia. Sur de Australia.

Hacen referencia a los problemas más comunes, en lo que se refiere a la nutrición de la levadura, al momento de realizar una fermentación; así como sus características generales, posibilidades de recuperación y los principales factores a tener en cuenta para su crecimiento y desarrollo.

La información obtenida a través de esta investigación constituyó un aporte conceptual sobre las levaduras en general. Para de esta forma, hacer de sus requerimientos nutricionales una prioridad a la hora de incluir la levadura en el mosto, ya sea desde azúcares, vitaminas, compuestos nitrogenados y la cantidad de estos que son asimilables por la levadura; hasta el momento en que se deben añadir dichos nutrientes, para que la fermentación sea exitosa.

- Jiménez-Martí y Del Olmo (2007). Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. Artículo publicado en la revista Federation of European Microbiological Societies, 08/11/2007, p. 245 - 256. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Burjassot, Valencia, Spain.

Compararon el efecto de la adición de amoníaco y aminoácidos a las células de levadura ubicadas en un medio deficiente de nitrógeno, en condiciones de vinificación a nivel molecular. Los resultados indicaron que la adición de amoníaco da lugar a una mayor expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos; mientras que, la adición de aminoácidos prepara las células para la biosíntesis de proteínas, demostrando que la reprogramación genética diferencial se produce en las primeras horas después de la adición.

El aporte de esta investigación se basó en clarificar ideas en cuanto a la selección de la fuente nitrogenada para la fermentación alcohólica. A través del panorama conceptual y experimental presentado, los resultados indicaron que los aminoácidos constituyen una opción viable como precursores de nitrógeno, razón por la cual se seleccionó la L-arginina; esto, debido a que, según conclusiones de esta investigación, tanto el amoníaco como los aminoácidos, permiten a las células de la levadura recuperarse de una situación de nitrógeno limitado, ayudando así a reiniciar el crecimiento en el mosto.

## **2.2. Bases teóricas**

DERECHOS RESERVADOS

Según Bavaresco (2006), las bases teóricas tienen que ver con las teorías que brindan al investigador el apoyo inicial dentro del conocimiento del objeto de estudio, es decir, cada problema posee algún referente teórico, lo que indica que el investigador no puede hacer abstracción por el desconocimiento, salvo que sus estudios se soporten en investigaciones puras o bien exploratorias.

### **2.2.1. Bebidas alcohólicas**

Tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica. Todo líquido azucarado sufre esta fermentación de manera espontánea debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol. (Carretero, 2012).

### **2.2.2. Fermentación alcohólica**

En términos generales, la fermentación se describe como un proceso de oxidación en el que la transformación de moléculas complejas a moléculas simples, conlleva a la generación de un producto final orgánico, con liberación de energía.

A diferencia de los procesos de oxidación comunes, donde el oxígeno o cualquier compuesto inorgánico oxidado es el que actúa como aceptor final, la energía química en la fermentación deriva de un proceso químico de fosforilación, por el que se da una transferencia de electrones que conduce a la generación de un compuesto orgánico oxidado. (Godoy, Herrera y Caicedo, 1987).

### **2.2.2.1. Conceptos básicos sobre fermentación alcohólica**

Según Williamson (2017):

- Mosto

DERECHOS RESERVADOS

Término que se refiere al vino antes de fermentar. Es la mezcla de los ingredientes (agua y miel) antes de inocular.

- Inocular

La acción de cultivar y/o agregar levadura al mosto. También, se puede inocular con un cultivo natural.

- Sedimentos, biomasa, posos

Levadura muerta acumulada en el fondo del recipiente. Sin embargo, puede utilizarse para la cocina y de la misma manera, conservar en el vino, ya que contiene vitaminas, complejo B, y demás nutrientes.

### **2.2.2.2. Procesos químicos en la fermentación alcohólica**

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias, donde el sustrato celular, mono y disacáridos en su

mayoría, son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (abreviado NAD<sup>+</sup> en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (abreviado NADP<sup>+</sup> y NADHP) y enlaces de alta energía de fosfato, como el adenosín trifosfato o ATP. (Nielsen, Villadsen y Lidén, 2003).

En la Figura 2.1 se puede observar que, la energía se sintetiza como ATP a partir de un proceso de glicólisis, al que sigue el metabolismo del piruvato. De este modo, la fermentación complementa la glucólisis y hace posible producir energía en ausencia de oxígeno.

Los procesos catabólicos inician luego de que los azúcares son transformados en glucosa-6-fosfato (G6P) o fructosa-6-fosfato (F6P). A partir de allí, se desarrolla la glucólisis y el metabolismo del piruvato.

La glucólisis, contempla una serie de reacciones intermedias dentro la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y la vía fosfato-pentosa (PP).

La teoría EMP (1934) explica los procesos de la fermentación; considerando que esta empieza con la reacción entre los ácidos gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato, los cuales producen simultáneamente ácido fosfoglicérico (2-fosfoglicerato) y ácido  $\alpha$ -glicerofosfórico (3-fosfoglicerato).

En procesos aeróbicos, el piruvato es oxidado dentro del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o TCA; sin embargo, en procesos anaerobios, es la forma reducida de la coenzima NAD la que se oxida, generando simultáneas reducciones del piruvato a acetato, ácido láctico o etanol, en el caso del metabolismo de la fermentación alcohólica.

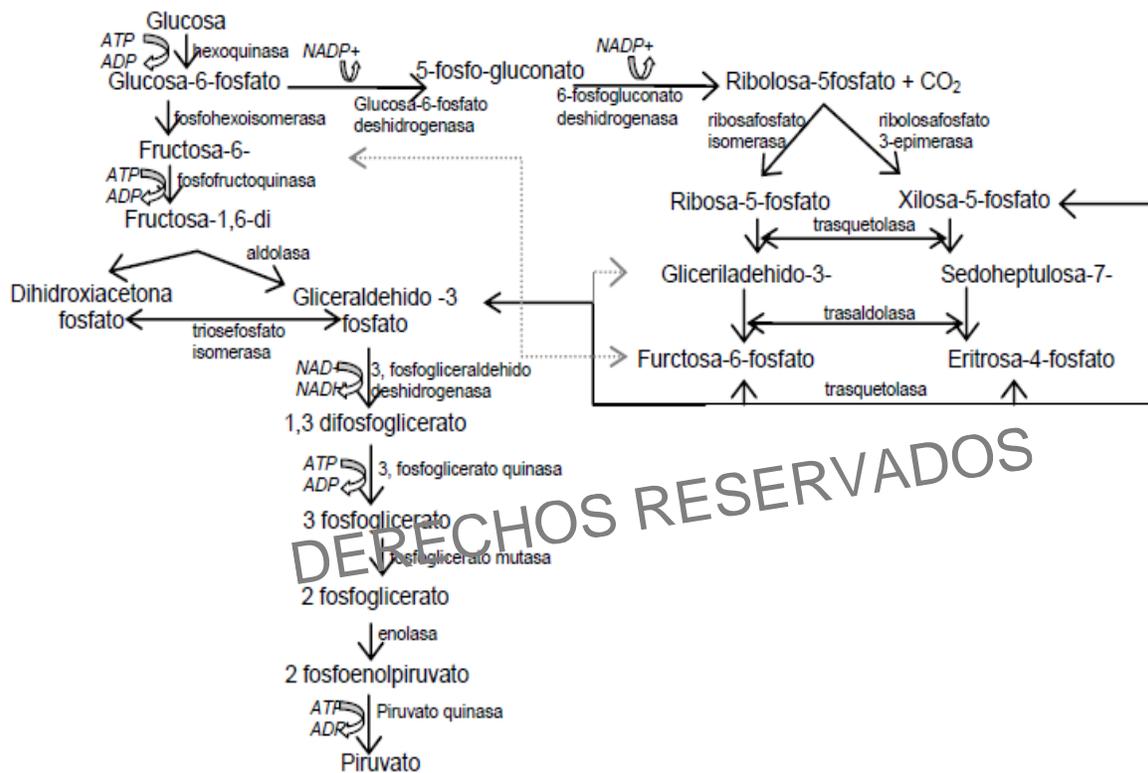
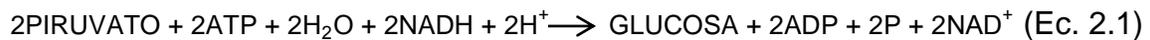


Figura 2.1. Sistema de reacciones en la glucólisis. (Nielsen et al., 2003).

La ruta EMP sigue la estequiometría dada por la ecuación 2.1, mientras que, con los precursores de metabolitos, ribosa-5-fosfato (R5P) y eritrosa-4-fosfato formados en la ruta PP, no sólo se ajusta la ruta EMP sino que adicionalmente se suplen los procesos anabólicos de la célula con equivalentes de reducción del tipo NADHP.



Donde:

ATP: Adenosín trifosfato

NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido

ADP: Adenosín difosfato

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido

En la Figura 2.2 se puede observar que, luego de la glicólisis, en las levaduras, el piruvato se descarboxila a aldehído para la generación de etanol, sin la intervención de Acetil-CoA (acetil coenzima A).

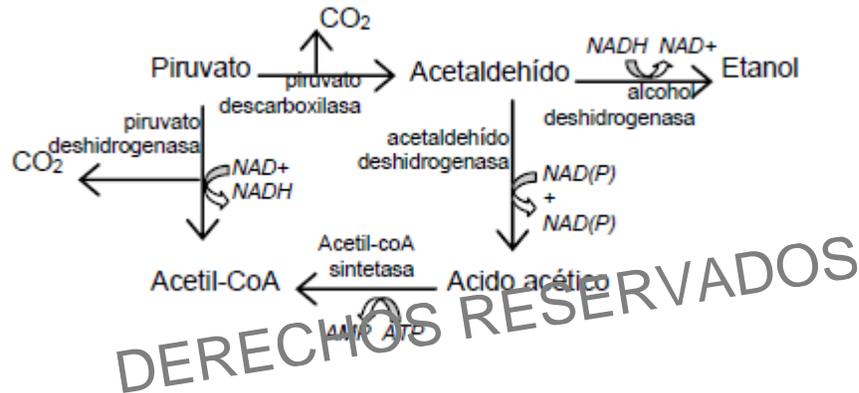


Figura 2.2. Metabolismo fermentativo en las levaduras. (Nielsen et al., 2003).

Sin embargo, del acetato presente en el citosol, es posible sintetizar Acetil-CoA que se emplea como precursor de ácidos grasos, y por la acción del complejo enzimático piruvato-deshidrogenasa el Acetil-CoA mitocondrial puede iniciar una regeneración del NAD con reducción del piruvato a ácido láctico y/o acético, lo que se conoce como una fermentación mixta (Figura 2.3).

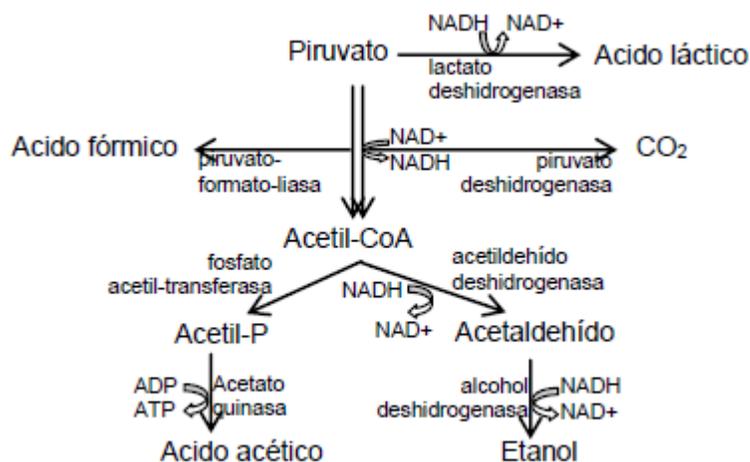


Figura 2.3. Metabolismo fermentativo mixto. (Nielsen et al., 2003).

El etanol es el producto principal del metabolismo fermentativo de las levaduras, sin embargo, en presencia de oxígeno, ciertos anaerobios facultativos permiten que el Acetil-CoA mitocondrial conduzca al piruvato a una fosforilación oxidativa dentro del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, generándose así metabolitos secundarios.

### 2.2.3. Miel de abeja

Codex Alimentarius (2001, p. 1) establece que:

La miel es la sustancia dulce natural producida por abejas *Apis mellifera* a partir del néctar de las plantas (miel de flor o miel de néctar), de las secreciones de partes vivas de plantas o excreciones de insectos *Hemiptera* succionadores de plantas (miel de mielada), que las abejas recolectan, transforman y combinan con sustancias propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal de miel para madurar.

Durante mucho tiempo en la historia de la humanidad, la miel ha sido una fuente importante de carbohidratos por ser un edulcorante natural disponible en gran medida. Además de sus propiedades nutricionales, es uno de los productos más conocidos en la antigua medicina tradicional, debido a su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, en la curación de heridas, quemaduras y como agente antimicrobiano. También, se empleó en la antigüedad como símbolo de diferentes actividades culturales y religiosas. (Crane, 1980).

Por otro lado, en cuanto a las propiedades funcionales atribuidas, se considera tanto la actividad antioxidante como antibacterial, relacionadas con el contenido de ácidos y compuestos fenólicos asociados, así como con el nivel de peróxido de hidrogeno y componentes como lisozima, ácidos fenólicos y flavonoides, respectivamente. (Weston, 2000).

Estos últimos compuestos, ofrecen una acción contra bacterias grampositivas y gramnegativas, según la respuesta antagónica que presenta la miel frente a la actividad patógena de agentes como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (Willix, Molan y Harfoot, 1992).

### **2.2.3.1. Miel de abeja como sustrato de fermentación**

Según Rodríguez (2005), es común encontrar mieles fermentadas por acción natural, proceso debido principalmente al incremento en la humedad, lo cual, además de acelerar la cristalización, modifica la actividad acuosa y la presión osmótica propiciando el crecimiento de diferentes levaduras, que generalmente conllevan a la producción de alcohol y ácidos orgánicos.

El descubrimiento de estas mieles fermentadas data desde hace más de 7000 años, según reportes tanto en la civilización egipcia, china, iraní, así como persa e india. En efecto, el vino de miel era una bebida considerada como el néctar de los dioses, por emplearse solo en rituales y ceremonias por los efectos “mágicos y curativos” atribuidos.

### **2.2.3.2. Caracterización de la miel de abeja**

Según su origen botánico, la miel puede clasificarse como monofloral o multifloral, si las abejas se alimentan predominantemente en un tipo de planta o en varias especies botánicas, respectivamente.

La miel se compone principalmente de carbohidratos, menores cantidades de agua y componentes menores como minerales, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos fenólicos, enzimas y otros fitoquímicos. Sin embargo, la composición de la miel es bastante variable y

depende de la fuente floral, el clima, las condiciones ambientales y estacionales, así como de las prácticas de manejo y procesamiento.

- Carbohidratos

Representan alrededor del 95 – 99 % de la materia seca en la miel. La fructosa (38.2 %, valor medio) y la glucosa (valor promedio de 31.3 %) son los principales carbohidratos en la miel, seguidos de la sacarosa (valor promedio de 0.7 %). Además, se han detectado otros 25 oligosacáridos, que incluyen maltosa, isomaltosa, trehalosa; trisacáridos como rafinosa y melezitosa; trazas de tetra y pentasacáridos, entre otros.

Según el Codex Alimentarius (2001), la concentración mínima de azúcares reductores, glucosa y fructosa es del 60 % p/p. La proporción de fructosa a glucosa es altamente dependiente de la fuente de néctar y generalmente es de 1.2:1 (fructosa:glucosa). La concentración de estos azúcares influye en el dulzor y la textura de la miel, ya que, la fructosa es más dulce que la glucosa y las mieles con proporciones más altas de fructosa/glucosa permanecen líquidas durante períodos más prolongados, debido a que, la glucosa es menos soluble en agua que la fructosa.

- Azúcares o grados Brix

En términos composicionales, la miel se identifica como una solución sobresaturada de azúcares (sólidos solubles), los cuales constituyen alrededor del 80 - 90 % de la composición total, siendo fructosa y glucosa los azúcares predominantes. Sin embargo, la relación en la que se encuentran en la miel, depende del origen floral y geográfico. (Persano y Piro, 2004).

En cuanto al contenido de disacáridos, como sacarosa y maltosa, el de mayor preponderancia es la sacarosa, ya que, representa un 5 - 10 % p/p; incluyéndose,

a su vez, carbohidratos como turanosa, isomaltosa, maltulosa y maltosa, en donde, un alto contenido de este último puede indicar adulteración por jarabe de azúcar o almidón hidrolizado. (Codex Alimentarius, 2001).

- Humedad

Según White (1975), este factor está en un rango 17 a 20 % de la composición total de la miel. Esta propiedad, a su vez, afecta la composición restante, comprendida por componentes minoritarios tales como minerales, vitaminas, fenoles y ácidos; donde estos últimos, a pesar de comprender tan solo el 0,5 % de la composición de la miel, son determinantes en la clasificación por origen botánico, en su aporte a las propiedades funcionales de la miel y en la estabilidad frente a microorganismos y/o reacciones químicas.

- Nitrógeno

El nitrógeno total en la miel, procedente del material vegetal y de las propias abejas, es bajo, su contenido medio es de 0.04 % la composición de la miel, con valores extremos entre 0 y 0.13 %, que varían en función del tipo de esta.

Dicho aporte de nitrógeno se distribuye principalmente en aminoácidos, péptidos, proteínas y derivados de adición de ácidos nucleicos. El contenido de aminoácidos corresponde a aproximadamente 10 g/kg. Sin embargo, la composición de aminoácidos de la miel es altamente variable dependiendo de su origen, por lo que el perfil de aminoácidos es un buen indicador del origen botánico y geográfico de la miel.

La prolina es el principal aminoácido en la miel, que corresponde a valores entre el 50 % y el 85 % del total de aminoácidos libres. El contenido de prolina debe estar por encima de 200 mg/kg. Los valores por debajo de 180 mg/kg indican una posible adulteración de la miel por adición de azúcar.

Además de la prolina, se han identificado otros 26 aminoácidos en la miel: ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, histidina, glicina, arginina, triptófano y cisteína, entre otros.

El contenido de proteínas es relativamente bajo, aproximadamente de 2 a 4 g/kg. Las proteínas en la miel son principalmente enzimas: invertasa, diastasa, glucosa oxidasa, catalasa,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa. Algunas enzimas surgen durante el proceso de maduración de la miel.

Las enzimas, diastasa e invertasa, son importantes para evaluar la calidad de la miel, ya que se utilizan como indicadores de frescura de la misma. La diastasa cataliza la hidrólisis del almidón en disacáridos y monosacáridos y es relativamente estable al calor y al almacenamiento.

La invertasa, cataliza la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa. El peróxido de hidrógeno, el contenido de agua y el factor antibacteriano encontrado en la miel están regulados por las enzimas glucosa oxidasa y catalasa. Por lo tanto, la actividad enzimática puede indicar la exposición al calor durante el procesamiento y almacenamiento de la miel. (White, 1975).

- Microorganismos

Aunque la miel presenta una actividad antibacterial catalogada muchas veces como medicinal, debido a la alta concentración de sólidos que controla el crecimiento bacteriano, presenta un contenido apreciable de microorganismos proveniente de la misma contaminación de las abejas y por la influencia de factores externos durante la extracción y el almacenamiento. (Finola, Lasagno y Marioli, 2007).

Dentro de la flora microbiana presente en la miel se encuentran bacterias del género *Bacillus*, tanto en estado esporulado como vegetativo, que, en general, no

tienen efectos negativos sobre la miel, aunque pueden detectarse en algunos casos especies como *Bacilluslarvae* y *alvei*.

La presencia de hongos y mohos por su parte, está asociada al contenido intestinal de las abejas y del ambiente, reconociéndose entre ellos géneros como *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Peyronelia* y *Mucor*. (Gilliam y Prest, 1978).

Según Salamanca et al. (2001), de la misma forma, existe la posibilidad de contaminación a partir de hongos del tipo *Acosphaeraapis*, además de la acción de *Acosphaeramajor*.

Las levaduras, son del tipo osmófilo, pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo la más frecuentes *Saccharomyces bisporus* variedad *Mellis*, *Saccharomyces rouxii*, y *Saccharomyces baillii* variedad *osmophilus*. Esta flora es introducida por la abeja en la colmena, con el néctar, polen o mielato, o por las mismas abejas durante las operaciones de limpieza, al vehicularlos sobre o dentro de su organismo; por lo cual, se ha establecido por parte de Mercosur un límite máximo de 102 UFC/g para el conteo de hongos y levaduras. (Finola et al., 2007).

- Agua

Se presenta en un rango entre el 15 % y el 20 %, con un valor promedio del 17.2 %. El contenido de agua de la miel depende de varios factores como las condiciones climáticas, grado de madurez de la colmena, tratamientos aplicados durante la recolección y almacenamiento de néctar y miel. Además, este parámetro influirá en sus propiedades físicas, como la viscosidad.

La miel con un alto contenido de agua generalmente presenta problemas de conservación y almacenamiento porque aumenta la probabilidad de fermentación del producto. De hecho, el bajo contenido de agua contribuye a la estabilidad de la miel, evitando la fermentación y la cristalización durante el almacenamiento.

- **Minerales**

Proviene del suelo y las plantas y están presentes en pequeñas cantidades que van desde el 0.04 %, en las mieles transparentes, hasta el 0.2 %, en algunas mieles oscuras. Además, se pueden agregar otros elementos durante los procesos de centrifugación y almacenamiento.

El potasio es el mineral principal, con un promedio de aproximadamente un tercio del total, seguido de calcio, sodio, fósforo, magnesio, hierro, manganeso y cobre. Los oligoelementos como aluminio, yodo, cloruro, flúor, bromo, bario, entre otros, también se encuentran presentes en la miel pero en cantidades menores.

La composición mineral depende del entorno, la ubicación geográfica y las especies botánicas. De hecho, las mieles de flores ligeras comúnmente tienen un contenido mineral más bajo que las mieles oscuras.

- **Ácidos orgánicos**

Comprenden ácido glucónico, resultante de la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa, seguido de concentraciones menores por los ácidos pirúvico, málico, cítrico, succínico y fumárico. Estos ácidos representan el 0.5 % de la materia seca, la acidez y el sabor característico de la miel.

La acidez de la miel también depende de la especie botánica y del tiempo de cosecha. La presencia de levaduras osmófilas adaptadas a altas presiones osmóticas, como las altas concentraciones de azúcar, suelen ser responsables del aumento de la acidez. Por lo tanto, una baja acidez, por debajo del límite máximo de 50 mmol/kg indica la ausencia de fermentación no deseada.

La mayoría de las mieles son ácidas, con un pH que varía de 3.4 a 6.1 y un valor promedio de 3.8. Sin embargo, este parámetro no está directamente relacionado

con la acidez libre debido a la capacidad amortiguadora de la miel, que depende de los fosfatos, carbonatos y otros minerales de la miel.

- Vitaminas

El contenido de vitaminas en la miel es bajo y varía con el origen floral. La mayoría son vitaminas solubles en agua debido a la naturaleza acuosa de la miel y un bajo porcentaje de lípidos.

Las vitaminas C (ácido ascórbico), B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>6</sub> (piridoxina), B<sub>3</sub> (niacina), B<sub>5</sub> (ácido pantoténico) y K (filoquinona) se han reportado, siendo el ácido ascórbico la vitamina principal que se encuentra en la miel, con concentraciones que oscilan entre 22 y 25 mg/kg.

- Compuestos fenólicos

La miel contiene una diversidad de compuestos fenólicos como constituyentes secundarios, como son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los derivados del ácido fenólico.

Los principales polifenoles son los flavonoides, en concentraciones que pueden variar entre 0.6 y 4.6 g/kg, y se encuentran principalmente en la miel producida en condiciones secas y de alta temperatura.

Los ácidos fenólicos se encuentran en concentraciones que oscilan entre 0.01 y 10 mg/kg, siendo los más predominantes los ácidos gálicos y p-cumáricos.

El contenido fenólico de la miel está altamente relacionado con sus propiedades bioactivas, a saber, las actividades antioxidantes y antimicrobianas.

- Compuestos volátiles

Se derivan de la fuente botánica o del néctar, del proceso de transformación llevado a cabo por las abejas, del calentamiento o manejo durante el procesamiento y almacenamiento, o de la contaminación microbiana y ambiental.

Los compuestos aromáticos están presentes en concentraciones muy bajas, principalmente como mezclas complejas de componentes volátiles con diferente funcionalidad y peso molecular relativamente bajo.

De hecho, se han identificado más de 300 compuestos volátiles en diferentes mieles, incluidos hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, cetonas, ácidos, ésteres, derivados del benceno, furanos, piranos, norisoprenoides, terpenos y compuestos de azufre.

Por lo general, las mieles monoflorales poseen perfiles de aroma altamente individuales en comparación con los multiflorales. El perfil volátil representa una huella química de la miel monofloral porque la naturaleza y la cantidad de compuestos volátiles están relacionados con la fuente floral.

Asimismo, la determinación de compuestos volátiles se ha utilizado para diferenciar las mieles según el origen botánico y el origen geográfico.

Las diferencias entre las fuentes geográficas se pueden atribuir a las condiciones climáticas y a la flora circundante; sin embargo, los compuestos volátiles parecen contribuir más a la diferenciación de la miel según su origen botánico que a su país de origen.

- Color

Constituye un criterio de clasificación útil para las mieles monoflorales, porque

está relacionado con el contenido de fenólicos, flavonoides y minerales.

El contenido mineral influye en el color y el sabor; las mieles con mayor cantidad de minerales tienen color más oscuro y sabor más fuerte.

El color de la miel también depende del procesamiento, la temperatura y/o el tiempo de almacenamiento y puede variar desde agua blanca, extrablanca, ámbar extraclaro, ámbar claro, ámbar, al ámbar oscuro.

Sin embargo, es importante determinar que la intensidad del color aumenta durante el almacenamiento debido a las reacciones de Maillard, la caramelización de la fructosa y las reacciones con compuestos polifenólicos.

- Densidad

La densidad de la miel debe estar comprendida entre 1.41 y 1.44 g/mL. (Suescún y Vit, 2006).

- Índice de refracción

Permite determinar de manera rápida y precisa la humedad de la miel; en el caso de las mieles, el contenido de agua está en función inversa a su índice de refracción. El valor promedio de agua en la miel de 17.2 % corresponde a un valor de índice de refracción de 1.49. (Crane, 1975).

#### **2.2.4. Hidromiel**

La miel, debido a su alta osmolaridad resulta un medio inapropiado para el crecimiento de microorganismos, pero al incrementar su actividad acuosa, pueden alcanzarse valores propicios para el crecimiento de levaduras, generándose

fermentaciones espontáneas que se asocian al deterioro en la calidad de la miel, puesto que se modifican su sabor, aroma y apariencia. (White, 1975).

Sin embargo, si este proceso se hace de forma controlada empleando levaduras especializadas para la fermentación alcohólica, no representa un deterioro en la calidad de la miel, por el contrario, significa el desarrollo de un producto que añade valor a toda la cadena apícola.

Se identifica el hidromiel tradicional como una bebida que contiene un grado alcohólico, en volumen, de 8 % - 18 %; resultante de la fermentación alcohólica de la miel de abeja. (Mendes-Ferreira et al., 2010).

Es una bebida popular en Europa Oriental (Polonia, Eslovenia) y en los Estados Bálticos; también, se consume ampliamente en Inglaterra, Alemania y, especialmente, en los países africanos, por ejemplo, Etiopía y Sudáfrica. En Portugal, el hidromiel, también conocido como aguamiel, todavía se produce en casa según los procedimientos tradicionales y empíricos.

Esta bebida alcohólica es reconocida como la más antigua consumida por los humanos, tal vez incluso antes del vino y se considera la precursora de la cerveza. Tiene una larga herencia de uso por más de 5000 años, aunque la evidencia arqueológica disponible para su producción se remonta al año 7000 a.C.

El primer lote de hidromiel probablemente ocurrió cuando llovió en un recipiente abierto de miel y la levadura silvestre hizo el resto. En el norte de China se han encontrado vasijas de cerámica que contienen mezclas de hidromiel, arroz y otras frutas con compuestos orgánicos de fermentación. La primera descripción conocida se encontró en el Rigveda y se remonta de 1700 a 1100 a.C.

En los últimos años, ha habido un gran aumento en la demanda, después de que

la bebida se puso de moda en los Estados Unidos. La American Mead Makers Association, una organización dedicada a promover el hidromiel y reunir a sus fabricantes, enumera a casi 240 cerveceros de aguamiel en los Estados Unidos y 40 en el resto del mundo.

#### **2.2.4.1. Consideraciones en la producción de hidromiel**

Se inicia con el aseguramiento de un medio de crecimiento adecuado para la levadura de fermentación, que no represente estrés alguno por alta presión osmótica o baja concentración de sales minerales, y controlando su flora natural de manera que no haya competencia con las levaduras de fermentación. (Bertello, 2001).

- Esterilización

Primero, se deben limpiar los materiales y equipos a emplear en la fermentación, es decir, asegurarse de que se encuentren libres de polvo, residuos, etc., para posteriormente esterilizar de manera efectiva. Se suele emplear Star San (esterilizante de base ácida utilizado en la industria cervecera), soluciones de agua y alcohol u otro producto químico.

- Fermentación primaria o fermentación tumultuosa

En función de los diferentes procesos desarrollados en cada región, se define al sustrato inicial como una dilución de miel en agua. Se emplean diluciones con contenidos de sólidos (azúcares) de 21 a 29 °Bx, dependiendo del dulzor de la miel y del porcentaje final de etanol deseado.

Después de la dilución, se puede agregar una mezcla de nutrientes, nitrógeno, minerales y factores de crecimiento, si es necesario, para estimular el crecimiento

y la fermentación de la levadura. También se puede hacer el ajuste de la acidez para obtener un mejor equilibrio entre la dulzura y la acidez.

De la misma forma, se puede ajustar el pH alrededor de un valor de 3.8, lo cual se hace adicionando ácidos como cítrico, málico o tartárico; aunque la miel suele no tener inconvenientes, puesto que su intervalo de pH va de 3.5 hasta 4.2. (Sroka, Tuszynski y Tadeusz, 2007).

Luego de acondicionar el mosto, debe esterilizarse de modo que se asegure un medio inocuo para el correcto funcionamiento de las levaduras, la pasteurización es uno de los métodos más utilizados. Por el contrario, se utilizan otras técnicas con el objetivo de controlar o inactivar la mayoría de los microorganismos silvestres, incluidas la ebullición del mosto o la adición de metabisulfito de potasio y dióxido de azufre.

Posteriormente, se inocula con cepas seleccionadas que suelen ser del género *Saccharomyces*, más específicamente, la *S. cerevisiae* de colecciones de cultivos o levaduras secas activas disponibles en el mercado, las cuales se adicionan cuando la temperatura del sustrato está alrededor de los 30 °C. (Navrátil, Sturdík y Gemeiner, 2001).

Con el mosto acondicionado, se debe realizar una agitación suave para incorporar oxígeno a la preparación, así como para homogeneizarla. Posteriormente, se espera una transformación de los azúcares de la miel en alcohol etílico y dióxido de carbono por medio de la adición de la levadura.

Finalmente se debe tapar con una válvula de fermentación (también llamada trampa de aire) para proteger al mosto de alguna contaminación externa, además de permitir la eliminación del gas carbónico (CO<sub>2</sub>), el cual genera presión dentro del recipiente de fermentación.

Esta etapa, muchas veces llamada fermentación tumultuosa (debido a que se forma una espuma sobre el líquido pareciendo que estuviera en ebullición), puede durar de 10 – 25 días. La duración dependerá del tipo de miel, los nutrientes añadidos al mosto de la miel, el tamaño del inóculo y las condiciones de fermentación.

La fermentación se realiza a temperaturas que oscilan entre 20 - 25 °C en un lugar alejado de la luz solar y se controla diariamente para reducir el riesgo de detención prematura. Esto se realiza hasta llegar a una densidad constante, donde se da por finalizada la primera fermentación.

Durante las primeras 36 horas suele apreciarse un crecimiento exponencial que se estabiliza hasta alcanzar una concentración de hasta 14 -16 % de etanol, el cual, no presenta mayor variación luego de 180 horas (aproximadamente una semana). (Ilha et al., 2000).

La fermentación debe controlarse adecuadamente puesto que la composición de la miel puede modificar comportamientos del metabolismo de las levaduras, donde se pueden generar cambios en el desarrollo de la acidez o la producción de subproductos como ésteres, que cambian la calidad organoléptica y alteran el proceso de fermentación en general. (O'Connor y Cox, 1991).

- Primer trasiego o trasvase

Una vez finalizada la fermentación tumultuosa, donde se alcanzó un adecuado rendimiento en el proceso (densidad constante) y una concentración superior a los 8 - 10 % v/v de etanol, se detiene la fermentación y se deben separar los sedimentos que precipitaron durante el proceso. Estos sedimentos están constituidos por levaduras muertas y materia orgánica que, si no se separan

rápidamente, comienzan a ceder aromas desagradables al líquido y aportan turbidez. A esta operación de separación de los sólidos se denomina: trasiego.

Durante la ejecución del primer trasiego, el hidromiel cristalino se debe extraer por la parte superior del recipiente, cuidando de no succionar los sedimentos que se encuentran debajo, con la manguera extractora o sifón.

Los sedimentos extraídos pueden colocarse en otro recipiente para que se compacten y obtener el líquido remanente para aumentar el rendimiento. Estos nunca deben mezclarse al hidromiel trasegado.

- Fermentación secundaria o maduración

Una vez realizada la separación de los sólidos, se continúa con la fermentación del líquido, pero ésta transcurre de una manera más lenta, ya que la cantidad de azúcar remanente es muy poca y la cantidad de levaduras disminuye debido al trasiego.

En esta etapa es donde se mejoran los aromas y las características organolépticas del hidromiel, debido a la separación de los sedimentos que se producen durante la fermentación primaria.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para que decante la turbidez restante (restos de proteínas y levaduras), que es aproximadamente 10 – 15 días, se puede efectuar un segundo trasiego.

- Segundo trasiego

Consiste en separar el hidromiel de los sedimentos finos precipitados, constituidos por los sólidos remanentes del primer trasiego. Se debe realizar extrayendo el

hidromiel por la parte superior del recipiente cuidando de no arrastrar los sedimentos, éstos se desechan.

- Clarificación

Si el líquido resultante quedara turbio, es necesario realizar este proceso para asegurarse la obtención de un producto clarificado (menor cantidad de biomasa posible). Las partículas que quedan en suspensión, requieren el uso de coagulantes que las ayuden a precipitar. Los clarificantes más empleados son la bentonita de sodio (0.3 g/L), clara de huevo, gelatina sin sabor y procesos de sulfitado ( $\text{SO}_2$  a 6 % v/v ó 100 mg/L), los cuales estabilizan el producto final para que este no se descomponga. (Pereira, Dias, Andrade, Ramalhosa y Estevinho, 2009).

Una vez agregado el clarificante, se agita suavemente para que todas las partículas suspendidas en el hidromiel entren en contacto con él y se deja reposar de 7 a 10 días en un lugar fresco y alejado de la luz. Una vez obtenidos los sólidos en el fondo del recipiente, se puede realizar un último trasiego.

- Tercer trasiego (opcional)

Este proceso es opcional, ya que también puede prolongarse la fermentación secundaria y realizar una clarificación previamente al segundo trasiego. De esta manera, el productor garantiza solamente dos trasiegos durante todo el proceso.

- Embotellamiento y refrigeración

Para el embotellado deben utilizarse botellas que soporten presión y el paso del tiempo sin influir negativamente en el producto final: botellas para cerveza, champán o sidra. El grosor de su cristal soportará perfectamente la presión de posibles períodos de fermentación tardíos o incluso la realización de una

fermentación mayor, además de que la parcial opacidad de su cristal es ideal para conservar mejor el producto sin alteraciones por exceso de luminosidad.

Si se quiere evitar un hidromiel gaseado y espumoso, se pueden añadir unos 7 – 8 g de dextrosa (azúcar) por cada litro obtenido.

Una vez trasvasada la bebida a las botellas definitivas estas se deben cerrar con corchos, los cuales asegurarán total hermeticidad de la botella. Posteriormente, las botellas se deben refrigerar al menos por un par de días.

Este proceso de refrigeración es necesario para evitar, en lo posible, que restos de la actividad de la levadura continúen trabajando y acaben por avinagrar el producto, ya que a temperaturas altas, la levadura queda inactiva.

- Envejecimiento

No existen registros que indiquen cuánto tiempo debe conservarse el hidromiel en óptimas condiciones de consumo, generalmente, la producción casera se consume pronto y no suele almacenarse mucho tiempo, tal vino joven.

El envejecimiento es importante en la producción de hidromiel, en particular para el desarrollo de compuestos aromáticos favorables, que generalmente pasan de un sabor áspero, ácido y desagradable, a una bebida suave con un buen aroma.

La duración del envejecimiento puede ser de meses o años, dependiendo del tipo de hidromiel. En general, hidromieles más ligeros estarán listos más pronto, mientras que los dulces y aquellos con mayor contenido de alcohol necesitarán más tiempo para desarrollarse por completo (Figura 2.4).

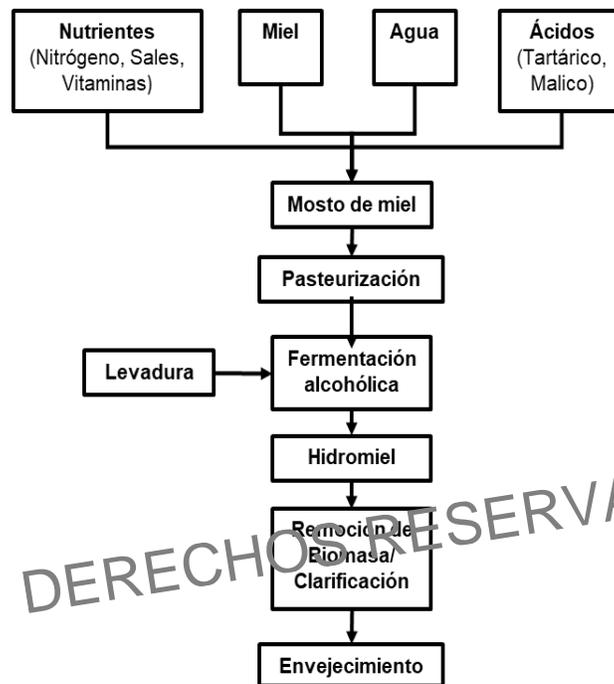


Figura 2.4. Producción de hidromiel. (Pereira, Oliveira, Mendes-Ferreira, Estevinho y Mendes-Faia, 2017).

A pesar de las excelentes propiedades de la miel, la producción de hidromiel puede conllevar a varios problemas, como la detención de la fermentación, lenta o prematura, la falta de uniformidad del producto final y la producción de sabores desagradables a las levaduras.

Muchos factores pueden estar relacionados con estos problemas, como la variedad de miel, la composición media (contenido de vitaminas, minerales y nitrógeno), la levadura fermentativa y las condiciones de fermentación (temperatura y pH).

La miel clara, en comparación con la oscura, tiene una deficiencia en la cantidad de compuestos de nitrógeno y en el contenido de minerales que deben complementarse mediante suplementación, teniendo en cuenta los requisitos de la levadura.

En cuanto a los componentes del sustrato de fermentación, es necesario considerar los siguientes aspectos:

- Levaduras

Son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica.

Las levaduras son más grandes que las bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco  $\mu\text{m}$ . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales (Pérez, 2007).

Las levaduras han sido utilizadas desde la antigüedad, actualmente se conocen cepas diferentes y específicas para la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX. (Hernández, Maza y Lozano, 2003).

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos. (Walker, 1998).

La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4.5 a 6.5.

En la fermentación alcohólica, participan diferentes especies de levaduras, y cabe destacar que, la vida de las levaduras en los líquidos es distinta a la de los mohos, ya que, mientras estos últimos viven en la superficie, las levaduras crecen en la masa del líquido, emergiendo a la superficie y creando una película llamada velo.

Según Anon (2005), las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas aptas para el consumo humano o GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized As Safe).

Hérrnandez (1999), establece que “la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de mayor uso en la industria vinícola, su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza).” (p. 74).

Es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa. (Querol, 2003).

Se describe normalmente como un anaerobio facultativo, de modo que crece tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, es capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono, di y oligosacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y hasta lactatos; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida, la cual metaboliza a etanol mediante la ruta EMP y el metabolismo anaeróbico del piruvato. (Dickinson y Scweiser, 2003).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un requerimiento energético en condiciones anaerobias de 0.036 g de célula/g de sustrato-hora y de 0.022 en condiciones aérobicas.

En función de la cepa empleada, se tiene un contenido residual de azúcar de 10 - 56 g/L, lo que influencia el tiempo de fermentación, el cual va de 119 a 170 horas, de manera que las condiciones de proceso deben ajustarse adecuadamente para obtener los mejores rendimientos de producción. (Sablayrolles, 2009).

El conjunto de la comunidad científica reconoce actualmente siete especies en el género *Saccharomyces*. Dos de ellas intervienen estrictamente en fermentaciones alcohólicas, se trata de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Según Benito (2013), dentro de esta última se distinguen dos variedades: *Uvarum* y *Bayanus*. La variedad *Bayanus* se asocia a la industria cervecera, mientras que la *Uvarum* se encuentra exclusivamente en enología.

La *S. cerevisiae bayanus* (también conocida como *ex-bayanus*) resultó ser la seleccionada por su alto poder alcoholígeno (14 – 18 %) y su capacidad de reiniciar de fermentaciones alcohólicas en condiciones críticas. (Lamothe-Abiet, 2007).

Asimismo, esta cepa es ideal para la elaboración de hidromieles secos y espumantes, debido a sus aptitudes fermentativas en una amplia gama de condiciones. De igual manera, su neutralidad aromática hace que sea igualmente empleada para la fermentación de vinos base.

Los factores a tener en cuenta para el crecimiento y desarrollo de la levadura son:

- Presión osmótica: La nutrición de la levadura es un proceso puramente osmótico, es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos para evitar la plasmoptisis y plasmólisis. El estrés osmótico puede causar una disminución en el volumen celular, afecta además, la velocidad de fermentación, así como la viabilidad celular. (Seo, 2005).
- Temperatura: Las altas temperaturas ocasionan una disminución de la biomasa, producto de un descenso en el contenido de proteínas, RNA, DNA y aminoácidos libres e induce a la rigidez de la membrana celular. Temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo. (Tomasso, 2004).
- Desecación: Es uno de los principales agentes que inhiben las actividades y desarrollo de los microorganismos.

- Luz: En general, la luz es perjudicial para los microorganismos que carecen de clorofila, o cualquier otro pigmento que les permita usar la energía de las radiaciones en el proceso de fotosíntesis.
- pH: El pH óptimo en el cual se desarrollan mejor los microorganismos, está entre 4.5 y 6.5. Las levaduras tienen la ventaja de soportar, medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que es aprovechado en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato. (Lee y Janson, 1996).
- Alcohol: El efecto del etanol en la célula es una combinación de inhibición del crecimiento y disminución de la viabilidad, puede actuar como inhibidor de la fermentación a partir de un 8 %. Sin embargo, no es recomendable terminar la fermentación con un grado alcohólico muy elevado. (Rieguel y Kent, 2003).

- Nutrientes

La adición de nutrientes provee un ambiente propicio a la levadura para que se obtengan los mejores rendimientos en la fermentación. La asimilación de nitrógeno y la demanda de oxígeno son factores importantes que influyen no sólo el rendimiento del proceso sino la expresión de las características sensoriales.

En función de los nutrientes incluidos o ausentes del medio de fermentación, se hacen aportes importantes en la protección de las células a factores de estrés, lo que influye directamente en la tasa de crecimiento, la degradación de sustrato y los cambios sobre el producto final. (Sablayrolles, Dubois, Manginot, y Barre, 1996).

Se consideran problemas de fermentación la deficiencia de nitrógeno, minerales y otros factores de crecimiento. La corrección de estas deficiencias nutricionales

puede reducir la sensibilidad al estrés de la levadura, mejorando el rendimiento de la fermentación.

Las vitaminas, cuya concentración no suele ser limitante, son requeridas por las células de la levadura para muchas reacciones enzimáticas.

Los minerales son necesarios como cofactores para vías metabólicas que influyen en la tasa de conversión de azúcar.

Sin embargo, la deficiencia de nitrógeno es la principal causa de la fermentación atascada o lenta, porque el nitrógeno afecta el crecimiento de la levadura, la tasa de fermentación de la levadura y la duración de la fermentación.

La concentración de nitrógeno también regula la formación de subproductos, como ácido sulfhídrico, ácidos grasos, alcoholes superiores y ésteres, entre otros, que afectan las propiedades químicas y sensoriales de la bebida alcohólica.

En la fermentación alcohólica, *S. cerevisiae* normalmente requiere un mínimo de 267 mg/L expresado como nitrógeno, para la fermentación completa de un mosto que contiene 200 g/L de hexosas (glucosa más fructosa), en un tiempo industrialmente razonable.

A pesar de esto, existen diferencias en la demanda de nitrógeno según la cepa de levadura industrial, la calidad de la fuente de nitrógeno o la concentración de azúcar en el mosto.

De hecho, la suplementación de las deficiencias de nitrógeno con la adición de DAP (fosfato diamónico) constituye una práctica bastante común en la producción de hidromiel. En otros casos, las deficiencias nutricionales de la miel se deben complementar en forma de nutrientes comerciales.

➤ Nitrógeno: La mayoría de los aminoácidos sirven como fuente de nitrógeno, aunque no todos se asimilan igual. Generalmente se adicionan sales de amonio y mezclas de aminoácidos; donde la glicina es el más efectivo y la metionina la menos efectiva. (Bely y Barre, 1990).

El proceso de asimilación del nitrógeno inicia en la conversión del amoníaco a glutamato, por la deshidrogenasa presente. Seguido de esto, parte del glutamato es convertido en glutamina, que representa una fuente importante de nitrógeno celular. (Cooper, 1982).

Otro factor a considerar en la adición de nitrógeno son los tiempos de adición ya que, si se consideran desde la inoculación, el nutriente es metabolizado y usado para el crecimiento mismo de las levaduras, mientras que, si es empleado al comienzo de la fase estacionaria, será usado como reactivador de las levaduras existentes, puesto que la presencia de amonio se asocia a la activación de la fosfofructoquinasa, enzima primordial en el inicio de la glucólisis. (Cramer, Vlassides y Block, 2002).

La L-arginina es un aminoácido que posee varias funciones metabólicas, como la participación en el transporte, transformación, excreción de nitrógeno, la síntesis de urea y como sustrato en la síntesis de creatina y óxido nítrico. Se encuentra en una gran variedad de alimentos ricos en proteínas, tanto de origen animal como vegetal. (Salinas, 2014).

➤ Oxígeno: Pese a que la producción de etanol se desarrolla dentro del proceso anaeróbico, la presencia de oxígeno permite el mantenimiento de la viabilidad celular al final de la fermentación.

La adición de oxígeno mejora la síntesis de biomasa, de modo que se incremente la tasa de fermentación, ya que es un factor importante en la síntesis de los lípidos

constituyentes de la membrana celular y que influyen la velocidad general de la reacción. (Rosenfeld, Beauvoit, Blondin y Salmon, 2003).

Se emplea en promedio una concentración de 5 a 10 mg/L, hacia el final de la fase de crecimiento, donde resulta ser de mayor aprovechamiento para las levaduras. Puesto que, una temprana adición puede afectar las concentraciones de alcoholes y ésteres, donde adicionalmente el desarrollo de procesos oxidativos puede afectar negativamente el producto, por descenso en el rendimiento y deterioro del aroma. (Sablayrolles et al., 1996).

De este modo, controlando la dosis y adición, al final de la fase de crecimiento de las levaduras, es posible combinar los efectos del nitrógeno y oxígeno para mejorar el rendimiento y velocidad de la reacción.

➤ Vitaminas: en cuanto a las vitaminas, suelen emplearse mezclas que incluyen biotina, tiamina, inositol y ácido pantoténico, esenciales para el desarrollo metabólico de la célula. Se ha encontrado que cuando se tienen bajos niveles de tiamina y elevadas concentraciones de nitrógeno se genera un detenimiento de la fermentación. (Sablayrolles, 2009).

Del mismo modo, la ausencia de procesos de la vía metabólica de la tiamina se asocia al incremento de sulfuro de hidrógeno dentro de la fermentación. (Bartra, Casado, Carro y Campama, 2010).

#### **2.2.4.2. Aspectos fisicoquímicos**

Existen diferentes aspectos a considerar en el análisis de hidromiel, por un lado en función de los ingredientes empleados, ya que, se ha encontrado que el color de la miel influye, no sólo en el contenido de fenoles totales que se relaciona con la actividad antioxidante atribuida, sino que, además, implica un mayor contenido de

fuentes nutricionales a las levaduras, dado que el aporte dado por el polen es mayor e implica mejores contenidos de nitrógeno. (Pereira et al., 2009).

Otro factor de importancia relacionado con el acondicionamiento del sustrato, radica en el control tanto de la concentración de azúcares como de la acidez del medio, puesto que la concentración de azúcares es un factor determinante en la productividad y rendimiento de las levaduras, de allí que generalmente se manejen diluciones de 29 °Bx, como máximo.

Se ha demostrado que, frente al estrés osmótico se reduce la conversión de acetaldehído a etanol, esto dirige la producción hacia ácido acético, que a su vez reduce la síntesis de glicerol.

Adicional al control de azúcares en el medio, el control en la acidez es también importante, ya que, la generación de ácido acético y succínico, influye en la disminución de la velocidad de fermentación, debido a que, su carácter antiséptico modifica el funcionamiento de las levaduras.

Por otro lado, en lo que refiere a los compuestos volátiles del producto, se identifica en primer lugar, que en los compuestos predominantes de la miel se encuentra naturalmente benzaldehído, que durante la fermentación forma 1,3-butanodiol y 2,3-butanodiol, cuya concentración no varía sustancialmente a lo largo del proceso.

El fenilalcohol (2-fenil-etanol) que contribuye con el aroma final del producto, se genera en la fermentación y durante el envejecimiento, debido a la desaminación oxidativa de la fenilalanina. (Ilha, Bertoldi, Acassio y Corumbá, 2008).

En cuanto a los ésteres, el citrato de etilo se presenta en elevado contenido, aun mayor que en el vino, debido probablemente a la concentración de ácido cítrico presente en las mieles. (Zoecklein, Fugelsang, Gump y Nury, 2001).

Adicionalmente, la miel presenta naturalmente derivados furánicos de la descomposición de monosácaridos en medio ácido, cuya concentración se incrementa progresivamente con el almacenamiento y la exposición a tratamientos térmicos, que modifican en cierta medida, el perfil aromático del producto fermentado. (Muñoz, Copaja, Speisky, Peña y Montenegro, 2007).

Las lactonas generalmente son aportadas por la madera de los barriles de añejamiento y determinan el aroma final del producto, ya que, dependiendo de su concentración pueden otorgar aroma a madera o coco; y, a su vez, este envejecimiento en barricas aporta ciertos aldehídos. (Ibarra, Cortes y Botero, 2010).

#### **2.2.4.3. Panorama general**

Como se ha mencionado, Europa y Asia representan el área central en el comercio y difusión de hidromiel, y por ende, han desarrollado elaborados procesos, así como diferentes investigaciones, para el mejoramiento del proceso tradicional de manera que se estandarice la calidad final, se eliminen los inconvenientes asociados a la respuesta de las levaduras frente al estrés por osmolaridad y deficiencia de nutrientes, y se disminuyan los tiempos de producción incrementando la productividad y rendimiento.

En la actualidad, se realizan estudios con cepas nativas, donde se centran esfuerzos en el aislamiento de levaduras propias de la miel, para evaluar su productividad frente a cepas comerciales. (Ilha et al., 2008).

Adicional a los estudios con levaduras nativas, se identifican estudios desarrollados en la república eslovaca, donde se proponen mecanismos de producción para disminuir el tiempo de reacción y estandarizar la calidad final, implementando para ello una inmovilización de levaduras en geles de pectato de

calcio, de modo que, además de reducirse los costos generales del proceso, se ha desarrollado un sistema de dos columnas empacadas que trabajan en continuo a 30 °C por 60 horas y obtienen un hidromiel de 16 % v/v etanol. (Navrátil et al., 2001).

El avance en la investigación y desarrollo de procesos tecnificados para la producción de hidromiel, muestran la importancia que esta bebida tiene en Europa.

En países africanos, su producción y distribución es igualmente importante; en Etiopia, por ejemplo, se produce una bebida bajo el nombre de “tej” u “ogol”, basada en levaduras nativas de la miel.

En otros países, como Lituania, el vino de miel fue certificado dentro de la legislación de alimentos de 1969; por lo cual, se tiene un gran número de variedades en función del origen botánico, geográfico y estacional de la miel, así como la dilución y tiempo de añejamiento empleado.

En América, solo en parte de Canadá y Norteamérica se reconoce esta bebida y se promueve por medio del Festival internacional de hidromiel y el “Real Ale Festival” donde se incluye una categoría para hidromiel y cidra, aprovechando que el mercado norteamericano en consumo de vinos orgánicos, representa US \$ 15,4 billones anuales, según reportó el portal Noticias Apícolas (2010).

Según Vidal (1983), en Latinoamérica, debido a la falta de cultura de consumo y poca comercialización del producto se limitan las posibilidades de abrir un mercado en este aspecto y el reconocimiento del mismo es muy bajo. Sin embargo, se avanza paulatinamente en investigaciones enfocadas en las condiciones de fermentación.

De modo que, en América Latina sólo hasta ahora se contemplan los primeros estudios de fermentación de la miel; siendo realmente Chile quien ha dado los primeros pasos en este proceso, con el estudio de mercado del producto y su investigación del desarrollo para el establecimiento de una planta productora con miras a competir en el mercado exterior, aprovechando la diferenciación botánica que proveen las mieles de las especies de abejas y ecosistemas latinos.

### **2.2.5. Aroma del hidromiel**

El perfil de aroma es una de las características más típicas de un producto alimenticio, tanto por su calidad organoléptica como por su autenticidad. El aroma de aguamiel tiene aportes de miel, levadura inoculada y procesos tecnológicos. (Pereira, Oliveira, Mendes-Ferreira, Estevinho y Mendes-Faia, 2015).

#### **2.2.5.1. Derivados volátiles de la miel**

El aroma a miel es muy complejo e involucra varios compuestos volátiles, sin embargo, no todos tienen un impacto significativo en el aroma. En general, el impacto de un compuesto dado depende de la medida en que la concentración supera su umbral de olor.

Es importante indicar que pueden producirse algunas interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre varios componentes, y por lo tanto, incluso los compuestos presentes en bajas concentraciones pueden contribuir al aroma de miel. (Kaskonienè y Venskutonis, 2010).

Los mismos compuestos volátiles identificados en varias muestras de miel pueden caracterizarse por una amplia gama de descriptores de aroma, por ejemplo, desde amargo o rancio a dulce y floral. (Manyi-Loh, Ndip y Clarke, 2011).

### 2.2.5.2. Derivados volátiles de la levadura

Según Vilanova y Oliveira (2012), durante la fermentación alcohólica, las levaduras producen un rango de compuestos con fuerte importancia sensorial para la calidad del producto final.

Como resultado de la actividad metabólica de las levaduras, estos representan cuantitativamente la mayoría de los compuestos volátiles en los vinos; por lo tanto, estos microorganismos desempeñan un papel importante en el desarrollo del aroma del vino.

En la producción de volátiles, los compuestos se ven afectados por varios factores, incluida la cepa de levadura, el estado celular (libre o inmovilizado) y el tamaño del inóculo, así como por las condiciones de fermentación. (Wintersteen, Andrae y Engeseth, 2005).

El tipo de miel y la composición del mosto de miel también modulan la formación de compuestos volátiles. (Roldán, Muiswinkel, Lasanta y Caro, 2011).

Los compuestos volátiles producidos por las levaduras son:

- Alcoholes

Según Ugliano y Henschke (2009), son metabolitos secundarios de la levadura y, desde un punto de vista cuantitativo, son el grupo más importante de compuestos volátiles producidos por la levadura durante la fermentación alcohólica de azúcares, inclusive en la producción de hidromiel.

Entre los alcoholes se incluyen: 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (isoamiloalcohol) y 2-feniletanol (con agradable aroma a rosa), entre otros.

El alcohol más predominante es el 3-metil-1-butanol, en concentraciones que oscilan entre 90 y 350 mg/L. Otros alcoholes secundarios predominantes presentes en el hidromiel son 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-propanol y 2-feniletanol.

Generalmente, las concentraciones de alcoholes en hidromiel están por debajo de 300 mg/L, ya que, concentraciones por encima de 400 mg/L, pueden tener un impacto negativo en el aroma y el sabor, lo que da como resultado un fuerte olor y sabor picante. (Mendes-Ferreira et al., 2010).

- Ésteres

DERECHOS RESERVADOS

Se derivan de una reacción entre los ácidos grasos orgánicos o volátiles y el etanol (ésteres etílicos), o entre el ácido acético y los alcoholes superiores (acetatos), siendo los principales responsables de la fruta del vino y las bebidas fermentadas. (Ugliano y Henschke, 2009).

El acetato de etilo es cuantitativamente el éster más importante encontrado en el hidromiel, con un umbral de olor de 12.3 mg/L. (Escudero et al., 2004).

Otros ésteres encontrados, aunque en pequeñas cantidades, son acetato de isoamilo, acetato de 2-feniletilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Estos ésteres tienen aromas florales y afrutados. (Bartowsky y Pretorius, 2009).

La producción de éster por levaduras aumenta con la concentración de nitrógeno, con la adición de nutrientes al mosto de la miel, como el polen, y en hidromiel fermentado con células de levadura inmovilizadas. (Pereira, Oliveira, Mendes-Ferreira, Estevinho y Mendes-Faia, 2014).

- Ácidos grasos volátiles

Incluyen una mezcla de ácidos grasos de cadena lineal, resultantes de la oxidación  $\beta$  de ácidos grasos, generalmente denominada cadena corta (C2-C4), cadena media (C6-C10), de cadena larga (C12-C18), y un grupo de ácidos grasos de cadena ramificada, del metabolismo de los aminoácidos. (Ugliano y Henschke, 2009).

El ácido acético es cuantitativa y sensorialmente el ácido graso volátil más importante producido durante la fermentación alcohólica, representando más del 90 % de la acidez volátil total.

El ácido acético en concentraciones desviadas imparte un carácter similar al vinagre y se vuelve objetable en concentraciones de 0.7 a 1.1 g/L, la concentración óptima está entre 0.2 y 0.7 g/L. (Swiegers, Bartowsky, Henschke y Pretorius, 2005).

En general, el ácido octanoico es el principal ácido graso en el hidromiel, seguido de ácidos hexanoicos y decanoicos.

- Compuestos carbonilos

Según Nykànen (1986), las levaduras producen diversos compuestos carbonílicos a partir del metabolismo del azúcar, siendo el acetaldehído cuantitativamente el más importante, constituyendo más del 90 % del total de aldehídos en vinos y otras bebidas alcohólicas fermentadas.

Este compuesto se ha encontrado en hidromieles producidos por *S. cerevisiae* a concentraciones que oscilan entre 5 y 30 mg/L. Además, la concentración de este compuesto está relacionada con la composición del mosto, aumentando con la adición de polen y nitrógeno. (Pereira et al., 2015).

- Fenoles volátiles

Los fenoles volátiles tienen un umbral de detección relativamente bajo y, por lo tanto, se detectan fácilmente debido a su olor farmacéutico. Los fenoles volátiles más importantes son los etilfenoles: 4-etilguaiacol y 4-etilfenol; y los vinilfenoles: 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol.

### **2.2.6. Variedades de hidromiel**

Dependiendo de la proporción a la cual se diluye la miel, a 1:0.5, 1:1, 1:2 o 1:3 (miel:agua), se obtienen diferentes tipos de hidromiel. Empleando una terminología similar a la utilizada en el vino, los estilos de hidromiel se clasifican como secos, semidulces o dulces, según su concentración final de azúcar. (Morales, Alcarde y Angelis, 2013).

Para realzar su carácter y complejidad, una variedad de frutas, verduras, hierbas o especias (jengibre, cardamomo, clavo, tomillo, romero, laurel, salvia, perejil, hinojo, canela, nuez moscada, limón o naranja, entre otros) pueden añadirse, durante o después de la fermentación. (McConnell y Schramm, 1995).

Según American Mead Makers Association (2001), existen diferentes estilos o variedades de hidromiel, los cuales dependen de las tradiciones locales y de las recetas específicas empleadas.

#### **2.2.6.1. Melomel**

Contiene una fruta o una mezcla de ellas, que contribuyen con sabores ácidos sutiles a sabores de frutas intensos y reconocibles al instante. En función de la fruta empleada, el hidromiel puede tomar otra denominación.

#### **2.2.6.2. Cyser**

Producido cuando se fermenta con una mezcla de miel y jugo de manzana o cidra, sin agua adicional. Esta bebida tiene un carácter distintivo de manzana con un pronunciado aroma a miel, dulce y similar a un jerez.

#### **2.2.6.3. Pyment**

Es una bebida fermentada con una mezcla de jugo de uva y miel o una mezcla de vino de uva e hidromiel después de la fermentación. Tiene un carácter distintivo del vino de uva que se manifiesta en la acidez, el tanino y otras características de la uva, pero el carácter de la miel equilibra los sabores afrutados.

#### **2.2.6.4. Metheglin**

Elaborado con hierbas y/o especias, como lavanda, vainilla o jazmín.

#### **2.2.6.5. Braggot o bracket**

Bebida fermentada con cereales germinados, tales como la cebada malteada y lúpulo. Constituye un tipo de cerveza caracterizada por un aroma a miel y malta, con un ligero sabor amargo debido al lúpulo.

#### **2.2.6.6. Rodomel**

Elaborado con miel y pétalos de rosa.

De la misma forma, pueden fermentarse hidromieles con verduras como el ajo y usarlos para cocinar; así como también se puede producir una bebida gaseosa

con altas cantidades de dióxido de carbono, como resultado de una segunda fermentación natural, ya sea en botella o en tanques. (Baudar, 2018).

### **2.2.7. Evaluación sensorial del hidromiel**

Basada principalmente en los atributos del aroma y sabor, el análisis sensorial es indispensable para la evaluación de las características del alimento y para identificar los contribuyentes sensoriales o de calidad. (Vilanova, Genisheva, Masa y Oliveira, 2010).

Los compuestos volátiles desempeñan un papel clave en la determinación de la calidad de las bebidas, ya que son los principales contribuyentes al aroma y produce un efecto sobre las características sensoriales.

Según Smyth y Cozzolino (2013), se emplean dos tipos de metodologías para evaluar la calidad de los alimentos y las bebidas: la identificación y cuantificación de compuestos de aroma, como técnica de análisis objetivo; y/o métodos de comunicación basados en la evaluación humana de las características de calidad de los alimentos.

En general, las características sensoriales más importantes de las bebidas son el olor, el sabor y, en menor medida, el color; por lo que, su evaluación debería ser realizada por un panel de expertos o consumidores. (Robinson, Boss, Heymann, Soloman y Trengove, 2011).

Algunos de los atributos de aroma propuestos han sido floral, afrutado, dulce, ceroso, resina, madera, cítrico, ácido, picante, caramelo, balsámico, herbáceo, café, chocolate, rancio, químico y fermentado, entre otros.

Los atributos: ácido, dulce, astringente, fruta madura, caramelo tostado, picante y amaderado, se han seleccionado para la caracterización del sabor.

Sin embargo, la percepción sensorial es variable dentro de los individuos, el contexto de la experiencia del consumidor y la composición química del producto.

Por lo que, Roldán (2004), determinó un hidromiel de control para que los fermentadores compararan su producto con este estándar, describiéndose así, el aroma del hidromiel de control como floral (asociado con 2-feniletanol) y ácido similar al vinagre (presencia de ácidos 3-metilbutírico y hexanoico, acetato de etilo).

DERECHOS RESERVADOS

#### **2.2.8. Productos derivados del hidromiel**

Ilha, Torres, Porto y Meinert (2000), establecen que “la miel se produce prácticamente en todo el mundo, el 90 % de la cual se consume como miel de mesa y el 10 % se distribuye entre las industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas.” (p. 232).

A partir de la fermentación alcohólica de la miel, se pueden elaborar productos de alta demanda como el vinagre, al realizar la fermentación acética de hidromiel, obteniéndose valores aproximados de 5 L de vinagre de miel con 90 g/L de ácido acético, utilizando 1 kg de miel de abeja como materia prima.

Asimismo, en la pradera Makana Meadery ubicada en Sudáfrica, se encuentra otro producto derivado de esta fermentación alcohólica, como es la mostaza de hidromiel, elaborada mediante la mezcla de mostaza negra de grano entero con mostaza amarilla recién molida, vid de hidromiel, miel y sal.

## **2.3. Sistema de variables**

A continuación, se presentan las variables utilizadas en el presente trabajo especial de grado, así como también las definiciones que se aplican según la metodología empleada.

### **2.3.1. Definición nominal**

Determinación del efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, es decir, en la producción de hidromiel.

### **2.3.2. Definición conceptual**

Según Álvarez (2008), la definición conceptual consiste en la definición de la variable de estudio, la cual hace referencia a los objetivos de la investigación y se encuentra estrechamente relacionada con el cuerpo teórico, en el cual está contenida las hipótesis en cuestión.

#### **2.3.2.1. L-arginina**

Abreviada como Arg o R, de fórmula molecular  $C_6H_{14}N_4O_2$ , es uno de los 20 aminoácidos que se encuentran formando parte de las proteínas. Se encuentra involucrada en muchas de las actividades de las glándulas endocrinas. Su cadena lateral está formada por un grupo guanidino. (Barbul, 1986).

Por lo general, el organismo produce la cantidad total de L-arginina que necesita, ya que esta se encuentra en la mayoría de los alimentos ricos en proteínas (pescados, carnes, etc). Como suplemento, la L-arginina se puede ingerir de forma

oral o aplicar de manera tópica. Debido a que funciona como un vasodilatador (dilata los vasos sanguíneos), también se puede consumir para tratar afecciones cardiovasculares y la disfunción eréctil. (Mayo Clinic Foundation, 2018).

### **2.3.2.2. Fermentación alcohólica**

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico.

El etanol resultante de la fermentación alcohólica, se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas como el vino, la cerveza, la sidra, el cava, etc. (García, 2015).

### **2.3.2.3. Miel de abeja**

Sustancia espesa, pegajosa y muy dulce que elaboran las abejas con el néctar de las flores y que depositan después en las celdillas de los panales o en huecos naturales; se emplea en la alimentación por su alto valor nutritivo. (Gran Diccionario de la Lengua Española, 2016).

### **2.3.2.4. Hidromiel**

Es una bebida fermentada a base de miel y agua, reportada desde la antigüedad. Los griegos le daban por nombre “melikraton” y los romanos lo llamaban “agua mulsum”. Popularmente, se le otorgó el nombre de “bebida de los dioses”.

El hidromiel posee minerales, proteínas, vitaminas, antitóxicos y azúcares que lo hacen beneficioso para el cuerpo. Además, es una de las bebidas probióticas más antiguas, ya que contiene bacterias y levaduras. Algunas de sus propiedades son: aumenta la inmunidad (sistema inmunológico), combate infecciones y desintoxica el cuerpo. (Mendes-Ferreira et al., 2010).

### **2.3.3. Definición operacional**

Para llevar a cabo el objetivo general planteado, como primera actividad se caracterizó fisicoquímicamente la miel de abeja, realizando mediciones de: densidad (g/mL, hallada a través de cálculos analíticos, mediante la masa de miel y el volumen del cilindro graduado), pH, índice de refracción y grados Brix (mediante los sólidos solubles).

Posteriormente, se procedió a establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación: agua (L), miel (L), levadura (g/L de mosto), y L-arginina (g/L de mosto).

Se llevó a cabo el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja para poder determinar el efecto de la concentración de la L-arginina (adicionada a dos de los mostos), sobre las características fisicoquímicas: densidad (g/mL) y grados Brix (sólidos solubles), en función del tiempo. Además, se determinó el grado de alcohol (% v/v) en los tres hidromieles finales.

Por último, se determinó el efecto de la L-arginina sobre las características sensoriales: color, aroma y sabor (mediante la escala de Likert), aplicando un test de preferencia a un panel de degustadores, los cuales compararon el hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación (contenido de L-arginina), con el hidromiel de control (sin la adición de la fuente nitrogenada).

### 2.3.4. Operacionalización de las variables

Objetivo general: Determinar el efecto de la adición de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja (producción de hidromiel)			
Objetivos específicos	Variable	Sub-variables	Indicadores
1. Caracterizar fisicoquímicamente la miel de abeja	L-arginina	Características fisicoquímicas de la miel de abeja	Densidad (g/mL) Masa de la miel de abeja (g) Volumen del cilindro graduado(mL)  pH  Índice de refracción °Bx (sólidos solubles)
2. Establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación		Cantidades de los componentes de los tres sustratos de fermentación	Volumen de agua (L) Volumen de miel (L) Cantidad de levadura (g/L de mosto) Cantidad de L-arginina (g/L de mosto)
3. Determinar el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja		Características fisicoquímicas de los tres productos resultantes	°Bx (sólidos solubles) Densidad (g/mL) Alcohol (% v/v)
	Características sensoriales de dos de los hidromieles finales	Comparación de las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación (contenido de L-arginina), con respecto al obtenido en el tiempo fermentativo estándar (sin adición de la fuente nitrogenada)  Color (escala de Likert)  Aroma (escala de Likert)  Sabor (escala de Likert)	

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

En el presente capítulo, se exponen el tipo y los diseños de investigación aplicados en la realización del trabajo, así como también, los métodos de recolección de datos para obtener la información sobre cada una de las variables de estudio. La metodología consta de la descripción y el análisis de los métodos que se emplearán en el estudio de la investigación; esta metodología se centra más en el proceso de investigación que en los resultados, aunque estos últimos dependen de ella.

#### **3.1. Tipo de investigación**

Según Ander-Egg (1992, p. 57):

La investigación es un proceso reflexivo, sistemático, controlado y crítico que tiene por finalidad descubrir o interpretar los hechos y fenómenos, relaciones y leyes de un determinado ámbito de la realidad; una búsqueda de hechos, un camino para conocer la realidad, un procedimiento para conocer verdades parciales, o mejor, para descubrir no falsedades parciales.

Cervo y Bervian (1989), definen la investigación como “una actividad encaminada a la solución de problemas. Su objetivo consiste en hallar respuestas a preguntas mediante el empleo de procesos científicos.” (p. 41).

Para Sabino (2002), la investigación puede definirse como “un esfuerzo que se emprende para resolver un problema, claro está, un problema de conocimiento.” (p. 34).

Asimismo, cuando se va a resolver un problema de forma científica, es conveniente tener conocimiento detallado de los posibles tipos de investigación que se pueden seguir. Este conocimiento hace posible evitar equivocaciones en la elección del método adecuado para un procedimiento específico. Cabe destacar que, los tipos de investigación difícilmente se presentan puros; generalmente, se combinan entre sí y obedecen sistemáticamente a la aplicación de la investigación. (Tamayo, 2003).

De acuerdo a Hernández, Fernández y Baptista (2006), los estudios descriptivos “miden, evalúan o recolectan datos sobre diversos conceptos, aspectos, dimensiones o componentes del fenómeno a investigar”. (p. 117).

La investigación descriptiva, tiene como fin primordial describir algunas características fundamentales de conjuntos homogéneos de fenómenos, utilizando criterios sistemáticos que permitan poner en manifiesto su estructura o comportamiento. De esta forma, se pueden obtener datos que caracterizarían la realidad estudiada. (Sabino, 1992).

Se entiende por investigación descriptiva, aquella que comprende la descripción, registro, análisis e interpretación de la naturaleza actual, y la composición o proceso de los fenómenos. El enfoque se hace sobre conclusiones dominantes o sobre grupo de personas, grupo o cosas, se conduce o funciona en presente. (Tamayo, 2003).

Por otra parte, Arias (2012), señala que la investigación descriptiva consiste en la caracterización de un hecho, fenómeno, individuo o grupo, con el fin de establecer su estructura o comportamiento. Los resultados de este tipo de investigación se ubican en un nivel intermedio en cuanto a la profundidad de los conocimientos se refiere.

Arias (2006) establece que, “los estudios descriptivos miden de forma

independiente las variables y aun cuando no se formulen hipótesis, tales variables aparecen enunciadas en los objetivos de investigación.” (p. 25).

Según Miró (1944), “el objetivo de la investigación descriptiva consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos, procesos y personas”. (p. 37).

En base a lo descrito anteriormente, se puede considerar que según su propósito, la presente investigación es de carácter descriptivo, debido a que esta se orientó a recolectar la información real, arrojada por el estudio de la fermentación alcohólica de la miel de abeja, empleando una fuente nitrogenada (L-arginina) como nutriente para las levaduras; y su característica fundamental fue la de presentar una interpretación correcta.

En primera instancia, se caracterizó la miel de abeja, a través de la determinación de la densidad, pH, índice de refracción y °Bx. Posteriormente, se establecieron las cantidades de los compuestos de los tres sustratos de fermentación, así como las condiciones del proceso, respectivamente. Asimismo, se determinó el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel, mediante la determinación de las características fisicoquímicas (°Bx, densidad y grado alcohólico) de los tres hidromieles, y de las características sensoriales (color, aroma y sabor) de dos de ellos.

### **3.2. Diseño de la investigación**

De acuerdo con las características de una investigación de tipo descriptivo, se hace necesario elegir un diseño capaz de ajustarse a la necesidad de describir el fenómeno en estudio.

El diseño se refiere al plan o estrategia concebidos para responder a las preguntas

de investigación y ayuda a señalar al investigador lo que debe hacer para alcanzar el objetivo de estudio. (Hernández et al., 2006).

Para Arias (2006), “el diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado”. (p. 26).

Según Balestrini (2006), “el diseño de investigación es un plan global de investigación que integra, de un modo coherente y adecuadamente correcto, técnicas de recogida de datos a utilizar, análisis previstos y objetivos”. (p. 131).

Asimismo, de acuerdo a las necesidades de la investigación, se seleccionaron los tipos de diseño que esta requirió para su desarrollo. Para el presente trabajo especial de grado, se emplearon los siguientes:

### **3.2.1. Diseño no experimental**

Palella y Martins (2010, p. 87), establecen que:

El diseño no experimental es el que se realiza sin manipular en forma deliberada alguna variable. El investigador no sustituye intencionalmente las variables independientes. Se observan los hechos tal y como se presentan en su contexto real, en un tiempo determinado o no, para luego analizarlos. Por lo tanto, en este diseño no se construye una situación específica sino que se observan las que existen.

Una investigación no experimental es un tipo de pesquisa que no extrae sus conclusiones definitivas, o sus datos de trabajo, a través de una serie de acciones y reacciones reproducibles en un ambiente controlado para obtener resultados interpretables, es decir, a través de experimentos. No por ello, claro está, deja de ser una investigación seria, documentada y rigurosa en sus métodos. (Raffino, 2018).

El primer objetivo específico de esta investigación es de carácter no experimental, ya que, en la caracterización de la miel no se manipularon deliberadamente las variables a interpretar, sino que se observaron los fenómenos de interés en su ambiente natural, para luego describirlos y analizarlos.

### **3.2.2. Diseño de campo**

Según Arias (2012), la investigación de campo es aquella que consiste en la recolección de todos los datos directamente de los sujetos investigados, o de la realidad donde ocurren los hechos (datos primarios), sin manipular o controlar variables alguna, es decir, el investigador obtiene la información pero no altera las condiciones existentes. De allí su carácter de investigación no experimental.

En una investigación de campo también se emplean datos secundarios, sobre todo los provenientes de fuentes bibliográficas, a partir de los cuales se elabora el marco teórico. No obstante, son los datos primarios obtenidos a través del diseño de campo, los esenciales para el logro de los objetivos y la solución del problema planteado.

Para Sabino (2002), la investigación de campo corresponde a un tipo de diseño de investigación basada en informaciones obtenidas directamente de la realidad, permitiéndole al investigador cerciorarse de las condiciones reales en que se han conseguido los datos.

Ramírez (2010), establece que la investigación de campo puede ser extensiva, cuando se realiza en muestras y en poblaciones enteras (censos); e intensiva, cuando se concentra en casos particulares, sin la posibilidad de generalizar los resultados.

El primer objetivo específico cuenta, además, con un diseño de campo; ya que, se

caracterizaron tres muestras de miel de abeja, mediante la recolección de los datos directamente de la realidad donde ocurrieron los hechos, en este caso, en el laboratorio, con equipos como la balanza analítica digital y el refractómetro manual, sin manipular o controlar las variables, debido a que eso ocasionaría la pérdida del ambiente de naturalidad en el cual se manifestaban.

### 3.2.3. Diseño documental

Según Baena (1985), la investigación documental es una técnica que consiste en la selección y compilación de información a través de la lectura y crítica de documentos y materiales bibliográficos, bibliotecas, bibliotecas de periódicos, centros de documentación e información.

Por su parte, Garza (1988) señala que la investigación documental se caracteriza por el uso predominante de registros gráficos y sonoros como fuentes de información, registros en forma manuscrita e impresos.

La investigación documental es aquella que se realiza a través de la consulta de documentos (libros, revistas, periódicos, memorias, anuarios, etc.). Un tipo específico de investigación documental es la investigación secundaria, dentro de la cual se incluye la investigación bibliográfica y toda la tipología de revisiones existentes (revisiones narrativas, revisión de evidencias, meta-análisis, meta-síntesis). (Guerrero, Montoya y Hueso, 2014).

Asimismo, Chávez (1994) expresa que “los estudios documentales son aquellos que se realizan sobre la base de documentos o revisión bibliográfica. Esta investigación se efectúa en función de documentos escritos, numéricos, estadísticos, archivos oficiales, privados y prensa”. (p. 133).

El segundo objetivo específico consta de un diseño de investigación documental;

esto debido a que, se establecieron las cantidades de miel, agua y levadura sugeridas por la literatura, en este caso, un libro de texto.

En cuanto a la cantidad de L-arginina, con el fin de obtener una determinada concentración final de nitrógeno en los mostos (sugerida por un artículo científico), y mediante los conocimientos adquiridos, se establecieron dos cantidades diferentes de este aminoácido (una para cada mosto); de forma que, se pudiese determinar, al final de la investigación, cuál de las dos cantidades adicionadas resultó ser la más adecuada.

#### **3.2.4. Diseño experimental**

La investigación experimental se ha ideado con el propósito de determinar, con la mayor confiabilidad posible, la relación causa-efecto, para lo cual uno o más grupos se exponen a los estímulos experimentales, y los comportamientos resultantes se comparan con los comportamientos de u otros grupos, llamados de control, que no reciben tratamiento o estímulo experimental. (Tamayo, 2003).

Según Palella y Martins (2010), el diseño experimental es aquel según el cual el investigador manipula una variable experimental no comprobada, bajo condiciones estrictamente controladas. Su objetivo es describir de qué modo y por qué causa se produce o puede producirse un fenómeno. Busca predecir el futuro, elaborar pronósticos que una vez confirmados, se convierten en leyes y generalizaciones tendentes a incrementar el cúmulo de conocimientos pedagógicos y el mejoramiento de la acción educativa.

Los experimentos son estudios de intervención, porque el investigador genera una situación para tratar de explicar cómo afecta a quienes participan en ella, en comparación a quienes no lo hacen. (Creswell, 2005).

Los experimentos, tratamientos, estímulos, influencias o intervenciones (denominadas variables independientes), se utilizan cuando el investigador pretende establecer el posible efecto de una causa que se manipula en una situación de control, es decir, para observar los efectos de las variables independientes sobre otras características o variables dependientes. (Hernández et al., 2006).

Para el tercer y último objetivo específico, se considera el diseño experimental, ya que el mismo implicó una situación controlada, en la cual se manipuló intencionalmente la variable independiente (causa), en este caso, la cantidad (en gramos) de L-arginina, para analizar o medir las consecuencias de esa manipulación sobre una o más variables dependientes (efectos), como lo son: el tiempo de fermentación, grados Brix, densidad, grado alcohólico, color, aroma y sabor de los tres hidromieles.

En base a las variables independientes y dependientes del proceso, se definen como las variables controladas o intervinientes, las constituidas por: el volumen de agua, volumen de miel, cantidad de levadura, rango de temperatura, luz, presión osmótica, desecación, oxígeno, vitaminas y minerales de los fermentos.

Asimismo, un experimento puede servir para estudiar, por medio de dichas intervenciones controladas, el comportamiento de una determinada variable (fenómeno). En este caso, se diseñó un experimento destinado a determinar el efecto de la concentración de una fuente nitrogenada, como lo es la L-arginina (precursora del óxido nítrico), sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja.

### **3.2.5. Diseño cuantitativo**

La metodología cuantitativa de acuerdo con Tamayo (2009), consiste en el

contraste de teorías ya existentes a partir de una serie de hipótesis surgidas de la misma, siendo necesario obtener una muestra, ya sea en forma aleatoria o discriminada, pero representativa de una población o fenómeno objeto de estudio.

La investigación cuantitativa, es la que tiene como objetivo principal la cuantificación de los datos arrojados por el método de recolección de datos empleado. Para ello, usa el análisis estadístico. La cuantificación permite hacer generalizaciones teniendo en cuenta los resultados extraídos de una muestra. Este tipo de investigación generalmente se emplea en las ciencias físico-naturales. (Robles, 2019).

Además, el tercer objetivo específico abarca también el enfoque cuantitativo, puesto que, las variables controladas fueron fijadas desde el principio (antes de realizar algún experimento); de igual manera, se dio respuesta a la hipótesis principal de la investigación, a través de determinadas pruebas.

### **3.3. Técnicas de recolección de datos**

Tamayo (2009), indica que la recolección de los datos dependerá del tipo de investigación y del problema planteado. Esta puede efectuarse de diversas maneras, desde una ficha bibliográfica, mediante observaciones y entrevistas, utilizando cuestionarios o encuestas, hasta desarrollando una investigación solo para este fin.

Arias (2006), define las técnicas de recolección de datos como “el conjunto de procedimientos y métodos que se utilizan durante el proceso de investigación, con el propósito de conseguir la información pertinente a los objetivos formulados en una investigación.” (p. 376).

La selección de técnicas e instrumentos de recolección de datos, implica

determinar por cuáles medios o procedimientos el investigador obtendrá la información necesaria para alcanzar los objetivos de la investigación. (Hurtado, 2000).

Según Bavaresco (2008), las técnicas consisten en la observación y recolección de los datos por iniciativa propia, en la fuente primaria de investigación.

En el presente trabajo especial de grado, se emplearon las siguientes técnicas de recolección de datos:

### 3.3.1. Observación directa

Según Arias (2006), la observación directa es una técnica que consiste en visualizar o captar mediante la vista, de forma sistemática, cualquier hecho, fenómeno o situación que se produzca en la naturaleza o en la sociedad, en función de los objetivos de investigación preestablecidos. En la observación directa, el investigador pasa a formar parte de la comunidad o medio donde se desarrolla el estudio.

Según Tamayo (2003), “es aquella en la cual el investigador puede observar y recoger datos mediante su propia observación.” (p. 193).

De acuerdo a Méndez (2001), la observación directa es el proceso mediante el cual se perciben deliberadamente ciertos rasgos existentes en la realidad, por medio de un esquema conceptual previo, y con base en ciertos propósitos definidos generalmente por una conjetura que se quiere investigar.

Para la presente investigación, se empleó como técnica de recolección de datos la observación directa, ya que, se registró el comportamiento de las distintas variables durante el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja,

mediante su visualización y el empleo de diferentes instrumentos, así como equipos de laboratorio, para determinar el efecto de las mismas durante los experimentos.

### **3.3.2. Interacción personal**

Según Pérez y Gardey (2008), una relación interpersonal es una interacción recíproca entre dos o más personas. Se trata de relaciones sociales que, como tales, se encuentran reguladas por las leyes e instituciones de interacción social.

Las técnicas empleadas para la obtención de la información requerida por el investigador, mediante interacción con personas externas, pueden ser: entrevistas, encuestas, cuestionarios, test, análisis de casos, entre otros. (Ander-Egg, 1997).

El test de preferencia, el cual se vale de pruebas hedónicas, permite predecir el comportamiento de los consumidores frente a un producto, por lo que, es esencial para el desarrollo de uno nuevo o para mejorar la calidad de uno ya existente. (Korkman, 1998).

El test en cuestión, también llamado test de consumidores, intenta cuantificar la preferencia de los sujetos por el producto, midiendo cuando gusta o disgusta, es decir, el grado de aceptación y de satisfacción.

Según Hurtado (2000), la escala de Likert consiste en “un conjunto de ítems presentados en forma de afirmaciones o juicios, referidos al evento o situación actual acerca del cual se quiere medir la actitud.” (p. 479).

La escala de Likert es una escala psicométrica, utilizada en la investigación de mercados para la comprensión de las opiniones y actitudes de un consumidor hacia una marca, producto o mercado. Permite conocer el grado de conformidad

de una persona hacia determinada oración afirmativa o negativa. (Muguira, 2018).

En base a lo descrito anteriormente, se puede concluir que esta investigación es de carácter interactivo, ya que, se diseñó un test de preferencia basado en la escala de Likert, para su posterior uso frente a un panel de jueces o degustadores. El test, comprendido de una escala de cinco puntos entre las respuestas “muy superior” y “muy inferior”, se empleó para obtener informaciones de alto nivel de credibilidad que sirvan de base al presente trabajo especial de grado.

El test fue diseñado por los investigadores y consistió de cinco opciones de respuestas a fin de comparar el color, aroma y sabor del hidromiel cuyo tiempo de fermentación fue el menor (debido a la adición de L-arginina), con respecto al obtenido en el tiempo fermentativo estándar (debido a la ausencia de la fuente nitrogenada). Se establecieron las respectivas comparaciones entre ambos, para verificar si, además de reducirse el tiempo de fermentación en gran medida, las propiedades organolépticas del hidromiel obtenido en el menor tiempo, mejoraron o empeoraron por la adición del aminoácido y la rápida fermentación.

### **3.4. Instrumentos de recolección de datos**

Según Sabino (2002), los instrumentos son los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información tales como fichas, formatos de cuestionarios, guías, guías de entrevista, listas de cotejo, escala de actitudes u opiniones, entre otras.

Para Arias (1999), “los instrumentos son los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información.” (p. 53).

Los instrumentos principales que se utilizan en la recopilación de datos, independientemente de la modalidad investigativa o paradigma que se adopte, son

los siguientes: observación, recopilación o investigación documental, entrevista, cuestionario y encuestas. (Cerda, 2005).

Un instrumento de recolección de datos, es cualquier recurso que utilice el investigador para acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información. De este modo, el instrumento logra sintetizar toda la labor previa de la investigación, resume los aportes del marco teórico al seleccionar datos que corresponden a los indicadores y, por lo tanto, a las variables o conceptos utilizados. (Castro, 2013).

Los criterios de selección de los instrumentos de recolección de datos, expresan y reflejan las directrices dominantes del marco teórico, particularmente aquellas señaladas en el sistema teórico (variables, indicadores e hipótesis) para el caso del paradigma empírico-analítico y las fundamentaciones teóricas incluidas en este sistema.

Durante el desarrollo de esta investigación, se utilizaron como instrumentos de recolección de datos y procesamiento de los mismos: tablas, para registrar los resultados de la caracterización fisicoquímica de la miel, así como los datos arrojados por el hidrómetro, con respecto al seguimiento de los grados Brix y la densidad de los fermentos; y un test, para comparar dos de los hidromieles finales.

La razón por la cual se reportaron resultados para tres muestras de miel en las tablas, es porque se realizaron las pruebas por triplicado (con diferentes muestras), para obtener resultados más precisos. Los instrumentos de recolección de datos, presentados a continuación, están estructurados de manera que los datos expresados en ellos tengan un uso posterior.

#### **3.4.1. Determinación de la densidad de la miel de abeja**

Los parámetros correspondientes para la determinación de las densidades de las

tres muestras de miel de abeja a 23 °C y a presión atmosférica (ambas condiciones de operación constantes), se registraron en la tabla descrita a continuación.

Tabla 3.1. Datos para la determinación de las masas de miel de abeja

Muestra (miel)	Masa del cilindro graduado vacío (g)	Masa del cilindro graduado + muestra (g)
1		
2		
3		

En la Tabla 3.1, se expresaron los datos experimentales de los parámetros necesarios para calcular la masa (en gramos) de la miel de abeja contenida en el cilindro graduado, esto, mediante el uso de la balanza analítica digital Ohaus.

### 3.4.2. Determinación del pH de la miel de abeja

Para determinar el pH correspondiente a cada muestra de miel, a 23 °C y a presión atmosférica, se empleó el pHmetro digital Oaklon.

Tabla 3.2. pH de la miel de abeja

Muestra (miel)	pH
1	
2	
3	

La Tabla 3.2, se utilizó para registrar los datos que permitieron conocer otra propiedad importante, para determinar la pureza de la miel, como lo es el pH.

### 3.4.3. Determinación del índice de refracción de la miel de abeja

Tabla 3.3. Índice de refracción de la miel de abeja

Muestra (miel)	Índice de refracción
1	
2	
3	

La Tabla 3.3, se empleó para registrar los valores de los índices de refracción de las tres muestras de miel, reportados por el refractómetro manual ABBE Bausch & Lomb.

### 3.4.4. Determinación de los grados Brix de la miel de abeja

Tabla 3.4. Grados Brix de la miel de abeja

Muestra (miel)	°Bx
1	
2	
3	

El contenido de sólidos solubles (azúcares) fue seguido mediante grados Brix,

empleando el refractómetro manual; motivo por el cual, se implementó la tabla 3.4, ya que en ella se registraron los datos recolectados, en función de esta propiedad.

### 3.4.5. Seguimiento de los grados Brix

Tabla 3.5. Grados Brix de los mostos e hidromieles

Muestra	A	B	C
Día	°Bx	°Bx	°Bx
0			
3			
6			
9			
12			
15			
18			
21			
24			
27			
30			

La Tabla 3.5, se utilizó para registrar en ella los datos correspondientes al seguimiento de los grados Brix, en función del tiempo (en días), tanto en los mostos iniciales (después de haber realizado la dilución de la miel en el agua mineral), como en los tres hidromieles, durante el proceso de fermentación primaria.

Las mediciones se realizaron cada tres días, con el fin de asegurar un medio adecuado para el crecimiento y reproducción de las levaduras, y para verificar que, los sólidos solubles disminuyeran en función del tiempo, aumentando el grado alcohólico.

Donde:

Muestra A: es el hidromiel con 0 g de L-arginina (hidromiel de control).

Muestra B: es el hidromiel con 1.05 g de L-arginina.

Muestra C: es el hidromiel con 2.10 g de L-arginina.

### 3.4.6. Seguimiento de la densidad

Tabla 3.6. Densidades de los mostos e hidromieles

Muestra	A	B	C
Día	$\rho$ (g/mL)	$\rho$ (g/mL)	$\rho$ (g/mL)
0			
3			
6			
9			
12			
15			
18			
21			
24			
27			
30			

En la Tabla 3.6, se reportaron los valores correspondientes a las densidades de los mostos e hidromieles, cada tres días.

Las mediciones se hicieron con el fin de comprobar la influencia de la fermentación alcohólica sobre las densidades de los fermentos, cuyos valores, según la literatura, deben disminuir en función del tiempo.

### **3.4.7. Comparación sensorial de los hidromieles**

Para la comparación de las características sensoriales del hidromiel cuya cantidad de L-arginina resultó ser la más adecuada, es decir, cuya fermentación alcohólica fue la más rápida, con respecto al hidromiel de control (hidromiel A, 0 g de L-arginina), se empleó un test de preferencia como instrumento de recolección de datos, mediante el cual se comparó el color, aroma y sabor de estos dos hidromieles (ver Anexo 1).

El test empleado para la comparación sensorial, fue validado por tres profesores de metodología de la investigación de la Universidad Rafael Urdaneta, localizada en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela; de forma que, las modificaciones realizadas en el instrumento fueron sugeridas y aprobadas por cada uno de ellos.

## **3.5. Población y muestra**

Las estadísticas de por sí no tienen sentido si no se consideran o se relacionan dentro del contexto en el que se trabajan, por lo que, se hace necesario entender los conceptos de población y muestra, para comprender mejor su significado en la investigación educativa y social que se lleva a cabo.

### **3.5.1. Población**

López (2004), establece que la población es el conjunto total de individuos, objetos o medidas que poseen algunas características comunes observables en un lugar y en un momento determinado. De la población a estudiar, deben tenerse en cuenta las siguientes características:

Homogeneidad, que todos los miembros de la población posean las mismas características, según las variables que se vayan a considerar en la investigación.

Tiempo, se refiere al período de tiempo donde se ubica la población de interés. Se hace necesario determinar si el estudio es del momento presente o del pasado.

Espacio, se refiere al lugar donde se ubica la población de interés. Un estudio no puede ser demasiado abarcador, por falta de tiempo y recursos se debe limitar a un área o comunidad en específico.

Cantidad, se refiere al tamaño de la población, lo cual determina o afecta al tamaño de la muestra que se vaya a seleccionar. Además, la falta de recursos y tiempo también limitan la extensión de la población a investigar.

En la presente investigación, la población estudiada estuvo constituida por los habitantes de la parroquia Altagracia, localizada en el municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela.

### **3.5.2. Muestra**

López (2004), concluye que la muestra es un subconjunto fielmente representativo de la población. Existen diferentes tipos de muestreo, el seleccionado dependerá de la calidad y de cuán representativo se quiere que sea el estudio de la población.

Según Mata (1997), el muestreo es el método utilizado para seleccionar los componentes de la muestra del total de la población. Consiste en un conjunto de reglas, procedimientos y criterios, mediante los cuales, se selecciona un conjunto de elementos de una población que representen lo que sucede en toda su extensión.

El muestreo es indispensable para el investigador, ya que, es imposible entrevistar a todos los miembros de una población, ya sea por problemas de tiempo y

recursos, así como por esfuerzo. Al seleccionar una muestra se estudia una parte o un subconjunto de la población, pero la misma debe ser lo suficientemente representativa de ésta, para que luego pueda generalizarse con seguridad.

Los tipos de muestreo se dividen en dos grupos: probabilístico y no probabilístico.

De acuerdo a Pineda, De Alvarado y De Canales (1994), en el muestreo no probabilístico todas las unidades que componen la población no tienen la misma posibilidad de ser seleccionadas. También es conocido como muestreo por conveniencia, ya que no es aleatorio, razón por la que se desconoce la probabilidad de selección de cada unidad o elemento de la población. Existen cuatro tipos de muestreo no probabilístico: por cuotas, opinático o intencional, casual o accidental y bola de nieve.

En el muestreo intencional el investigador decide, según los objetivos y de acuerdo a su percepción, los elementos que integrarán la muestra, considerando aquellas unidades supuestamente típicas de la población que se desea conocer.

Por lo general, el investigador suele preocuparse constantemente por el tamaño de la muestra, el cual está determinado por el nivel de precisión requerido por el error de muestreo aceptable o dispuesto a tolerar; pero por regla, se debe usar una muestra tan grande como sea posible, de acuerdo a los recursos que haya disponibles, ya que, mientras más grande y representativa sea la muestra, menor será el error de muestreo.

Se conoce como error de muestreo a la diferencia entre el valor obtenido en la muestra (estadístico) y el correspondiente en la población (parámetro). Dicho error, sólo aplica cuando se somete una parte de la población a prueba. Por lo general, se establece el valor del error previamente, de manera que este se pueda controlar.

Al conocer el tamaño estimado de la población, la fórmula a aplicarse para calcular el tamaño de la muestra, según Arias (2012), es:

$$n = \frac{N \times Zc^2 \times p \times q}{e^2 \times (N-1) + Zc^2 \times p \times q} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde:

n: tamaño de la muestra a evaluar

N: número de individuos de la población

Zc: intervalo de confianza requerido para el experimento

p: probabilidad de éxito

q: probabilidad de fracaso

e: error máximo admisible

El tipo de muestreo seleccionado para esta investigación fue el muestreo no probabilístico, opinático; ya que, la muestra fue tomada de la población intencionalmente y estuvo constituida por representantes de los sexos masculino y femenino, cuyas edades comprenden desde los 18 hasta los 55 años, los cuales, dieron respuesta al test de preferencia para determinar el efecto de la L-arginina sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, en comparación con el obtenido en el tiempo estándar.

### 3.6. Fases de la investigación

Para legitimar y llevar a cabo el presente trabajo especial de grado, se requirió la

indagación de diversas referencias bibliográficas tales como: guías, revistas, artículos, tesis, publicaciones de internet, manuales, libros, entre otros. Esta investigación consta de tres fases, las cuales se explican detalladamente a continuación, así como el procedimiento aplicado para obtener cada uno de los resultados.

### **3.6.1. Fase I: Caracterización fisicoquímica de la miel de abeja**

Para comprobar la pureza de la miel (requisito esencial para el éxito de la fermentación alcohólica), se determinaron tres de sus propiedades para, más adelante, verificar los resultados obtenidos con los reportados por la literatura.

Cada uno de los procedimientos explicados a continuación, se realizaron por triplicado con tres muestras de miel de abeja provenientes de distintas botellas (las cuales formaban parte del volumen total de miel a emplear durante los experimentos), respectivamente. Dichas botellas, se seleccionaron al azar con el fin de obtener valores más exactos de densidad, pH, índice de refracción y grados Brix.

#### **3.6.1.1. Determinación de la densidad**

Entre los materiales y equipos empleados para determinar la densidad de las mieles, se encuentran:

- Miel de abeja cruda, 10 mL (por cada procedimiento).
- Cilindro graduado de 10 mL.
- Balanza analítica digital, marca Ohaus (ver Anexo 3).

El procedimiento llevado a cabo constó de:

- En primera instancia, se esterilizaron todos los materiales a utilizar durante la realización de este primer objetivo específico, con agua y desinfectante.
- Se pesó el cilindro graduado vacío en la balanza, para saber la masa neta de este.
- Seguidamente, se vertieron 10 mL de la muestra de miel en el cilindro.
- Luego, se procedió a pesar el cilindro graduado más la muestra de miel.
- Se restaron ambos valores (masa del cilindro vacío menos masa del cilindro más la muestra de miel), para de esta forma, obtener la masa de miel en gramos.
- Posteriormente, se dividió la masa de miel (g) entre el volumen del cilindro graduado (10 mL) para determinar así la densidad de la muestra en (g/mL) y reportarla en las tablas.

### **3.6.1.2. Determinación del pH**

Los materiales y equipos necesarios para determinar el pH de las muestras de miel, fueron:

- Miel de abeja cruda, 25 mL (por cada procedimiento).
- Vaso de precipitado de 150 mL.
- pHmetro digital, marca Oaklon (ver Anexo 4).

Para la determinación del pH se utilizó el siguiente procedimiento:

- Se vertieron 25 mL de miel de abeja en el vaso de precipitado.
- El vaso se colocó debajo del electrodo del pHmetro.
- Se procedió a introducir el electrodo en la muestra de miel contenida en el vaso de precipitado.
- Se leyó el valor de pH de miel reportado a través de la pantalla del pHmetro, para su posterior registro.

### 3.6.1.3. Determinación del índice de refracción

Para la determinación de esta propiedad de la miel, se emplearon los siguientes materiales y equipos:

- Miel de abeja cruda, una gota (por cada procedimiento).
- Gotero.
- Refractómetro manual, marca ABBE Bausch & Lomb (ver Anexo 5).

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Se limpió el prisma del refractómetro manual, mediante un algodón con alcohol.
- Se colocó, mediante la ayuda del gotero, una gota de miel entre las dos mitades del prisma del refractómetro y se leyó la escala de índice de refracción mediante el ocular. Se registró el valor.

#### **3.6.1.4. Determinación de los grados Brix**

Al igual que para la determinación del índice de refracción, los grados Brix se determinaron mediante el empleo de los siguientes materiales y equipos:

- Miel de abeja cruda, una gota (por cada procedimiento).
- Gotero.
- Refractómetro manual, marca ABBE Bausch & Lomb.

De la misma forma, se procedió a determinar los grados Brix de las muestras de miel de abeja:

- Se colocó, mediante la ayuda del gotero, una gota de miel entre las dos mitades del prisma del refractómetro.
- Se leyó la escala correspondiente al porcentaje de sólidos solubles (propiedad equivalente a los grados Brix) mediante el ocular del refractómetro, y se registró el valor.

#### **3.6.2. Fase II: Establecimiento de las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación**

En primer lugar, se fijó como producción 3 litros de hidromiel a partir de 4 litros de mosto base, en función de la disponibilidad de los botellones donde fermentar. En base a esa producción y, luego de haber realizado las correspondientes revisiones bibliográficas, se realizaron los cálculos analíticos pertinentes para hallar el volumen de agua, miel, levadura y L-arginina. Cabe destacar que, se evaluó la dilución de la miel en el agua mineral y se trabajó en función de la concentración

de azúcares en el sustrato.

Los volúmenes de agua y miel fueron medidos por medio de un envase cilíndrico de 1 500 mL y otro cilindro graduado de 250 mL; mientras que, la levadura fue medida de acuerdo a los gramos que contenía cada paquete.

Por otro lado, para medir las cantidades de L-arginina en polvo, se utilizó un recipiente de plástico y la balanza analítica digital; de forma que, la masa del recipiente fue llevada a 0 en la balanza para que esta pesara únicamente el polvo; posteriormente, se adicionó la L-arginina hasta lograr los gramos deseados. Este procedimiento se realizó dos veces, una para cada cantidad, respectivamente.

### **3.6.3. Fase III: Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja**

Para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, adicionando L-arginina a dos de los tres sustratos de fermentación, se emplearon los siguientes materiales y equipos:

- 3 botellones de vidrio de 5 L.
- 9 botellas de vidrio de 1 L.
- 10 botellas de vino de 0.70 L.
- Agua mineral Minalba, 15 L.
- Miel cruda, 3 L (ver Anexo 8).
- Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*), marca LALVIN

EC-1118, 15 g (ver Anexo 9).

- L-arginina en polvo, marca Nutricost, 3 g (ver Anexo 10).
- Gelatina en polvo sin sabor, marca Yelight, 9 g.
- 5 cajas de gasas asépticas, marca Eben.
- 3 corchos de goma (stoppers).
- 12 trampas de aire (airlocks).
- Jabón líquido, 5 L.
- Alcohol etílico, 5 L.
- Envase cilíndrico de 1 500 mL.
- Cilindro graduado de 250 mL, marca Pyrex (ver Anexo 2).
- 3 ollas pequeñas, de metal.
- 3 recipientes de cerámica.
- Sifón.
- Colador de acero inoxidable.
- Embudo de plástico.
- Hidrómetro, marca Chefast (ver Anexo 6).

- Termómetro.

Para el desarrollo de esta fase, se realizó el siguiente procedimiento:

➤ Esterilización

- En primera instancia, se procedió a desinfectar y esterilizar todos los materiales y recipientes (botellones de vidrio, corchos, trampas de aire, cilindro graduado y el hidrómetro) con jabón líquido, el cual se distribuyó tanto por el interior como por el exterior de los materiales y recipientes, agitando de forma que no quedara superficie sin impregnar.

- Después de eliminar los restos de jabón, se empleó una solución de agua y alcohol, efectuando el mismo procedimiento realizado con el jabón líquido.

- Por último, se empleó agua caliente previamente hervida, y se distribuyó de igual forma que el jabón líquido y la solución agua/alcohol.

Nota: la realización de este procedimiento es requerida para inactivar la flora del medio, disminuir la competencia de levaduras nativas y controlar la contaminación de los productos.

➤ Inoculación

La dosis de levadura y la rehidratación se hicieron según las especificaciones del fabricante (ver Anexo 9).

- Un volumen de 50 mL de agua (medido con el cilindro graduado de 250 mL), se calentó en una olla pequeña de metal, en la hornilla.

- Al alcanzar 35 °C (temperatura medida con el termómetro), se vertió el agua

en un recipiente de cerámica.

- Se adicionó la cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*ex-bayanus*) establecida en el objetivo 2, al agua contenida en el recipiente de cerámica.
- Se agitó el recipiente hasta disolver la levadura en el agua.
- Se dejó reposar la solución por 30 minutos, antes de verterla en el mosto, para rehidratar la levadura.

Nota: este procedimiento se realizó tres (3) veces, simultáneamente.

➤ Preparación de los mostos

- Paralelamente al reposo de la levadura, se agregó el volumen de agua mineral determinado previamente (objetivo 2) en cada botellón de vidrio de 5 L.
- Al agua se le adicionó el volumen de miel de abeja cruda determinada (objetivo 2), en cada botellón (ver Anexo 11).
- Se agitaron los tres botellones de vidrio para mezclar el agua y la miel, y de esta manera, crear una solución uniforme y homogénea de sustratos de fermentación (ver Anexo 12).

➤ Estabilización de grados Brix (concentración inicial de azúcares)

- Se tomaron muestras de 190 mL de los mostos contenidos en los botellones de vidrio, para medir, con el hidrómetro, el nivel de °Bx que determinarían el porcentaje potencial de alcohol de cada uno de los tres mostos.

- El nivel de grados Brix se monitoreó a medida que se adicionaba el agua, hasta alcanzar la concentración deseada de 28 °Bx en los mostos.

➤ Adición de la levadura

- Una vez hidratadas las levaduras, se adicionaron los tres inóculos contenidos en los recipientes de cerámica a los tres mostos, respectivamente, controlando que la diferencia de temperatura entre el mosto y el inóculo fuera inferior a 10 °C.

➤ Ajuste de nutrientes (adición de la L-arginina)

- Primero, se apartó un mosto para tomarlo como el hidromiel de control, es decir, el hidromiel sin la adición de fuente nitrogenada.
- Seguidamente, a los dos mostos restantes se les adicionaron las cantidades determinadas de L-arginina en el objetivo 2, respectivamente.

Nota: la adición de este aminoácido se realizó para asegurar el aporte de nitrógeno al mosto, y de este modo, no sólo promover un proceso con el mínimo contenido de componentes químicos, sino, además, para aprovechar al máximo las propiedades de la miel y no incrementar costos por gastos en materia prima adicional.

➤ Acondicionamiento de los botellones de vidrio

- Posteriormente, se sellaron los tres botellones con tres corchos de goma perforados en el centro, respectivamente.
- En el orificio perforado se introdujeron las tres trampas de aire, una para cada botellón (ver Anexo 13).

- A las trampas de aire se les adicionó agua mineral hasta el nivel indicado por la palabra: MAX. De esta forma, se impidió el paso de oxígeno hacia el interior del botellón (ya que la fermentación alcohólica es anaeróbica), y a su vez, se permitió la salida del CO<sub>2</sub> producido por las levaduras dentro del botellón. De forma que, el burbujeo de las trampas de aire indicaba proceso fermentativo.
- Por último, se ubicaron los botellones en un lugar oscuro y en un rango de temperaturas de 20 - 25 °C.

Nota: la preparación de la receta de hidromiel correspondiente a 4 litros de mosto base, en un botellón de vidrio de 5 L, se realizó con el fin de que el líquido tuviese aproximadamente 5 % de espacio libre dentro del botellón, de manera que este pudiese respirar y pudiese proveerse el espacio suficiente para que la capa de CO<sub>2</sub> producida durante la fermentación, protegiera al líquido de cualquier posibilidad de oxidación o contaminación.

➤ Fermentación primaria y seguimiento de las características fisicoquímicas (°Bx y densidad)

- Cada tres días, durante el proceso de fermentación primaria (ver Anexo 14), se retiró el corcho de goma (junto a la trampa de aire), de manera que se abrieran los botellones.
- Después de abrirlos, se introdujo un sifón en los botellones para succionar pequeños volúmenes de los sustratos de fermentación. Luego, estos fueron colocados en el cilindro graduado de 250 mL.
- Al tener las muestras de los sustratos, extraídas por el sifón, en el cilindro graduado, se introdujo el hidrómetro en este para realizar las respectivas mediciones de grados Brix y densidad (ver Anexo 15).

- Se midió la densidad de las muestras con el hidrómetro, y mediante la escala suministrada por el fabricante (ver Anexo 7), se determinaron los °Brix.
- Posterior a la caracterización de las muestras, estas fueron introducidas de nuevo en sus respectivos botellones.

Nota: se tomó como día cero (0) el día en que se prepararon los fermentos, y se continuaron las mediciones cada tres días a la misma hora (1:00 pm), hasta que cada fermentación primaria llegó a su fin, es decir, cuando los valores de las características fisicoquímicas (°Bx y densidad) se hicieron constantes, en función del tiempo.

- Parada de la fermentación primaria y realización del primer trasvase
  - El procedimiento general para frenar el proceso fermentativo primario, consistió en destapar los botellones y trasvasar (utilizando el sifón) el contenido de estos a botellas de vidrio de 1 litro, para eliminar la biomasa localizada en el fondo de los botellones (ver Anexo 16).
  - Las nuevas botellas (1 L) se llenaron hasta el tope.
- Determinación del grado alcohólico
  - Posterior al primer trasvase, se introdujo el hidrómetro dentro de las botellas de 1 L para realizar la última medición de densidad en los tres hidromieles resultantes.
  - Luego de realizar las respectivas mediciones, se les colocó una trampa de aire casera a cada una de las botellas, para proceder con el proceso de maduración.

➤ Fermentación secundaria o maduración

- Una vez realizada la separación de los sedimentos (primer trasvase o trasiego), se continuó con la fermentación del líquido, denominada en este punto como fermentación secundaria (ver Anexo 17), la cual se llevó a cabo en las botellas de 1 L, razón por la cual se les colocaron las trampas de aire previamente.
- Asimismo, las botellas fueron colocadas en un lugar alejado de la luz solar y en un rango de temperaturas de 20 – 25 °C.
- Se dejó decantar la turbidez restante por 15 días más.

Nota: la fermentación secundaria ocurre de manera más lenta, ya que la cantidad de azúcar remanente es muy poca y la cantidad de levaduras disminuye debido al trasvase. En este punto, no es necesario dejar 5 % de espacio libre dentro de la botella, ya que no hay posibilidades de oxidación.

➤ Parada de la fermentación secundaria y realización del segundo trasvase

- Posterior a los 15 días de la fermentación secundaria, se destaparon las botellas de 1 L y se separaron, nuevamente, los hidromieles de los sedimentos finos precipitados (constituidos por los sólidos remanentes del primer trasvase), con apoyo en el sifón y en las botellas de 1 L.

➤ Clarificación

- Paralelo a la realización segundo trasvase, se hidrataron 9 g de gelatina sin sabor en polvo con 30 mL de agua mineral caliente/g de gelatina, en los recipientes de cerámica, individualmente.
- Se dejaron reposar las soluciones gelatina/agua, hasta que estas estuvieran

a temperatura ambiente.

- Se adicionó el volumen de solución gelatina/agua correspondiente a las 9 botellas de vidrio de 1 L.
- Una vez agregado el clarificante (gelatina sin sabor en polvo) en cada botella, se agitó suavemente cada una de ellas para que todas las partículas suspendidas en los hidromieles entraran en contacto con él.
- A cada botella se le colocó su respectiva trampa de aire y se dejaron reposar en la nevera durante 7 días.

Nota: este procedimiento es necesario para que las partículas que quedan en suspensión, mediante el uso de coagulantes, precipiten.

➤ Parada de la clarificación, realización de la filtración y embotellamiento de los hidromieles

- Una vez obtenidos los sólidos en el fondo del recipiente, se realizó el último trasvase a manera de filtración, por medio de un colador de acero inoxidable.
- El colador se cubrió con gasas para asegurar que todas las partículas, incluyendo las más pequeñas, fuesen retenidas.
- Finalmente, el contenido de cada botella de vidrio de 1 L (en este punto, hidromieles clarificados y filtrados) se vertió directamente en botellas de vino de 0.70 L, cada una (ver Anexo 18).
- Las botellas se introdujeron en la nevera y se mantuvieron en refrigeración, hasta su posterior consumo.

➤ Envejecimiento

- Debido al factor tiempo, las pruebas sensoriales y a que la producción fue artesanal, los hidromieles se almacenaron durante dos meses (ver Anexo 21).

El proceso descrito anteriormente, fue realizado, en su totalidad, tres veces, para descartar la presencia de factores aleatorios en los resultados obtenidos en cada ensayo. Sin embargo, los tres ensayos arrojaron los mismos resultados numéricos y consecuentemente, la calidad de los productos se mantuvo invariable.

### 3.6.3.1. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características fisicoquímicas de los productos resultantes, en función del tiempo

Para determinar el efecto de la fuente nitrogenada sobre las características fisicoquímicas, se realizó el seguimiento cada tres días de grados Brix y densidad (de acuerdo al procedimiento anteriormente explicado), y se determinó el grado alcohólico final.

El contenido etanólico se determinó a partir de la medición inicial de densidad (día 0) en los tres mostos y la medición final de densidad de cada hidromiel (la cual varía en función del producto). Este cálculo se realizó mediante la fórmula suministrada por el hidrómetro marca Chefast, para determinar el grado alcohólico de los hidromieles.

$$\% \text{ alcohol} = \frac{\rho_o - \rho_f}{0.776} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

Donde:

$\rho_o$ : densidad inicial (medición realizada en el día 0)

$\rho_f$ : densidad final (medición realizada en el último día de fermentación primaria, correspondiente a cada hidromiel)

Se determinó, además, el tiempo de fermentación correspondiente a cada hidromiel, tomando como día inicial al día en que se prepararon los fermentos y, como último día de fermentación, al día en que los valores medidos de °Bx y densidad comenzaron a ser constantes. Cabe destacar que, el último día de fermentación varió en función del hidromiel en cuestión.

### **3.6.3.2. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, comparando con el obtenido sin la adición de la fuente nitrogenada (tiempo fermentativo estándar)**

Para comparar las características sensoriales (color, aroma y sabor) de dos de los tres hidromieles obtenidos, primeramente, se utilizó la Ecuación 3.1 para el cálculo del tamaño de la muestra correspondiente a la población de la parroquia Altigracia (ubicación de la sede donde se llevó a cabo la prueba sensorial), empleando un error máximo admisible del 15 %, un intervalo de confianza de 90 % (1.64), y una probabilidad de éxito y de fracaso de 50 %, respectivamente.

Posteriormente, fue aplicado el test de preferencia (ver Anexo 1), el cual se llevó a cabo en las instalaciones de INDESCA (ubicada en el Complejo Petroquímico Ana María Campos). La muestra de la población, constó de 30 personas (degustadores) para formar parte del test (ver Anexo 20).

Los degustadores pasaron de tres en tres al comedor de la empresa (donde se realizó la prueba), el cual es un espacio grande con alta iluminación y ventilación. Luego, se les explicó el formato de comparación sensorial, de manera detallada.

Posteriormente, se les facilitó, a cada degustador, dos vasos pequeños de plástico (transparentes) contenidos de volúmenes de aproximadamente 10 mL de las muestras de los dos hidromieles, respectivamente; los cuales, eran servidos de dos botellas de 500 mL de vidrio transparente, para mejor visualización y apreciación de los aspectos físicos de los dos hidromieles (ver Anexo 19).

Se les entregaron los formatos de comparación y, de la misma forma, se les facilitaron bolígrafos, paquetes pequeños de granos de café para neutralizar el olfato entre muestras durante la comparación del aroma, y pequeños vasos con agua potable para el enjuagado entre muestras durante la comparación del sabor. Por último, los degustadores procedieron a observar, a oler y a degustar los hidromieles, para dar respuesta a los formatos de comparación provistos.

Los datos obtenidos de ambas muestras (correspondientes a los dos hidromieles comparados), se ingresaron en el programa Microsoft Office Excel, para poder realizar el análisis estadístico, en base al promedio aritmético, a la moda y al porcentaje obtenido de cada una de las cinco opciones de respuestas o categorías, en función de las tres características sensoriales comparadas, para de esta forma, obtener las conclusiones respectivas.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se presentan y discuten los resultados de la investigación, los cuales fueron obtenidos en cada fase de la misma para lograr el objetivo general planteado. La interpretación de los resultados mostrados a continuación, permite la determinación del efecto de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja.

#### 4.1. Caracterizar fisicoquímicamente la miel de abeja

Para verificar la pureza de la miel de abeja, se caracterizó fisicoquímicamente la misma; con el fin de proporcionar resultados precisos durante los experimentos, ya que, la miel cruda (o pura) es elemento fundamental para el éxito de estos.

##### 4.1.1. Determinación de la densidad

Debido a que la densidad no fue medida directamente, para su determinación se siguieron una serie de pasos y se realizaron los debidos cálculos analíticos, mediante recolección de datos, los cuales fueron registrados en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Datos para la determinación de las masas de miel de abeja

Muestra (miel)	Masa del cilindro graduado vacío (g)	Masa del cilindro graduado + muestra (g)
1	27.29	41.41
2	27.67	41.95
3	30.62	44.98

Se puede observar que, en la Tabla 4.1 se expresaron los datos experimentales correspondientes a los parámetros necesarios para calcular las tres masas de miel, contenidas en los cilindros graduados.

En primer lugar, las masas de miel fueron halladas mediante el peso de los cilindros vacíos. Posteriormente, se pesaron los cilindros contenidos de las muestras de miel de abeja, respectivamente; y por último, al restar estos dos valores, se halló la masa (en gramos) de miel contenida en el cilindro.

El procedimiento previamente descrito, fue posible mediante el uso de la balanza analítica digital Ohaus.

Posterior a la determinación de las masas de los cilindros graduados vacíos y las masas de los cilindros contenidos de las muestras, por diferencia, se determinaron las tres masas de miel, las cuales se pueden observar en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Masas de miel de abeja

Muestra (miel)	Masa de la miel (g)
1	14.12
2	14.28
3	14.36

Nota: el volumen de los tres cilindros graduados empleados fue de 10 mL; el cual, permaneció constante.

Los parámetros correspondientes para la determinación de la densidad de la miel a 23 °C y 1 atm, se registraron en la tabla anterior (Tabla 4.2), mediante los datos

recolectados de las diferentes masas (g) de miel correspondientes a las tres muestras y el volumen (mL) del cilindro graduado; cuyo cociente, representa la densidad (g/mL) de la miel de abeja empleada, registrada en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Densidad de la miel de abeja

Muestra (miel)	Densidad (g/mL)
1	1.41
2	1.43
3	1.44
Promedio	1.43

En la presente Tabla 4.3, se registraron las densidades de las tres muestras de miel expresadas en g/mL.

El cálculo de la densidad promedio se realizó para tener un valor más exacto de la densidad de la miel de abeja empleada en los experimentos, y de esta manera, comprobar su pureza, descartando posibilidades de adulterado.

Según la literatura citada anteriormente (Suescún y Vit, 2006), la densidad de la miel pura varía entre 1.39 a 1.44 g/mL, rango entre el cual se encuentra el 1.43 g/mL determinado y expresado en la Tabla 4.3.

#### 4.1.2. Determinación del pH

El pH de cada muestra de miel, fue medido directamente mediante el pHmetro digital Oaklon y las condiciones de operación en las que se realizaron dichas

mediciones fueron 23 °C y 1 atm de presión; los datos fueron recolectados en la Tabla 4.4, expuesta a continuación.

Tabla 4.4. pH de la miel de abeja

Muestra (miel)	pH
1	3.77
2	3.78
3	3.78
Promedio	3.78

La Tabla 4.4, se utilizó para registrar los datos tomados directamente del pHmetro. De esta manera, se conocieron los valores de pH de las muestras y así se pudo comprobar una vez más, por medio de esta propiedad, la pureza de la miel de abeja.

De acuerdo con la literatura (Finola et al., 2007), el valor del pH promedio (3.78) se encuentra dentro del rango debido de pH para mieles puras, específicamente de 3.4 a 6.1 con un valor promedio de 3.80.

#### 4.1.3. Determinación del índice de refracción

Los valores correspondientes a los índices de refracción para cada una de las tres muestras de miel, fueron medidos directamente a través del refractómetro manual ABBE Bausch & Lomb, respectivamente.

Cabe destacar que, este procedimiento fue llevado a cabo a 23 °C y a presión

atmosférica. De la misma manera, los datos tomados fueron registrados en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Índice de refracción de la miel de abeja

Muestra (miel)	Índice de refracción
1	1.49
2	1.49
3	1.49
Promedio	1.49

Los tres índices de refracción para cada muestra de miel y el promedio de dichos valores fueron reportados en la Tabla 4.5.

El valor promedio de índice de refracción reportado (1.49), responde al valor que, según Crane (1975), debe poseer la miel para un promedio de 17.2 % de agua (cantidad de agua estrictamente requerida por la miel, en su estado de pureza), el cual corresponde a un índice de refracción aproximado de 1.49.

#### 4.1.4. Determinación de los grados Brix

Se entiende por grados Brix (símbolo °Bx), la unidad de cantidad utilizada para la determinación del cociente total de materia seca (generalmente azúcares), disuelta en un líquido. La escala Brix se utiliza en el sector de alimentos para medir la cantidad de azúcares en zumos de fruta, vino o bebidas suaves, y en la industria azucarera. (Boulton, Singleton, Bisson y Kunkee, 1996).

En esta oportunidad, se realizó la medición de los grados Brix de la miel de abeja para determinar la cantidad de sólidos solubles (azúcares) que esta contenía, mediante el uso del refractómetro manual ABBE Bausch & Lomb a 23 °C y a presión atmosférica. Asimismo, cada dato recolectado fue registrado en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Grados Brix de la miel de abeja

Muestra (miel)	°Bx
1	80.20
2	79.80
3	80.00
Promedio	80.00

En la tabla 4.6, se registraron los datos correspondientes al contenido de °Bx de las muestras de miel y su respectivo valor promedio; a través del cual, se puede verificar, nuevamente, la pureza de la miel de abeja empleada, ya que, el valor determinado (80.00 % de sólidos solubles) se encuentra dentro del rango debido establecido por los siguientes autores:

Según Persano y Piro (2004), la miel debe estar conformada por una solución sobresaturada de azúcares (sólidos solubles), representando estos un rango entre 80 – 90 % de su composición total.

Además, Cotte (2003) establece que el promedio general de azúcares de la miel está alrededor del 80 %, repartido entre un 38 % y 32 % de fructosa y glucosa, respectivamente.

## **4.2. Establecer las proporciones de los compuestos de los sustratos de fermentación**

Posterior a la caracterización fisicoquímica de la miel, se procedió a determinar las proporciones de los compuestos de los tres sustratos de fermentación: volumen de agua, volumen de miel, cantidad de levadura y cantidad de L-arginina.

### **4.2.1. Determinación de la proporción miel/agua**

Williamson (2017), expresa en su libro de Hidromieles y vinos caseros que, la dilución de miel en agua comúnmente empleada es 1:3, por lo que, se tomó esta relación como referencia para desarrollar los ensayos.

Para 4 litros de mosto base y una producción final de hidromiel de aproximadamente 3 litros (por botellón de vidrio de 5 litros), la proporción miel/agua establecida para la parte experimental de la presente investigación fue 1:3 litros, es decir, 1 litro de miel de abeja por 3 litros de agua mineral.

### **4.2.2. Determinación de la cantidad de levadura**

Con respecto a la determinación de la cantidad de levadura *S.c (ex-bayanus)*, marca LALVIN EC-1118, se empleó la cantidad sugerida por Williamson (2017): 5 gramos para un volumen de mosto base de 4 litros. En este caso, cada paquete estaba contenido de 5 gramos de levadura (puede variar según el fabricante), por lo que se utilizó completo por cada botellón de vidrio de 5 litros (ver Anexo 2).

La elección de la levadura *Saccharomyces cerevisiae (ex-bayanus)* se realizó en función de los productos finales deseados; ya que, este híbrido de levadura, especialmente la cepa 1118, es ideal para hidromieles secos y espumantes,

además de que es capaz de reactivar fermentaciones estancadas, en caso de que sea necesario.

#### **4.2.3. Determinación de la cantidad de L-arginina**

Para determinar las dos cantidades de L-arginina a ser empleadas en dos de los sustratos de fermentación, respectivamente, y debido a que no existen antecedentes de esta fuente nitrogenada en el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja, se realizaron una serie de cálculos tomando como punto de partida 50 mgN/L de concentración final de nitrógeno deseada en los mostos (cantidad final de nitrógeno sugerida por Blanco et al., 2012), y con base en los pesos moleculares del nitrógeno y de la L-arginina, se determinaron las cantidades de este aminoácido tolerables por las levaduras.

Como primera proporción de fuente nitrogenada, se estableció 0.53 g de L-arginina/L de mosto, es decir, 2.10 g de L-arginina/4 L de mosto.

Asimismo, para determinar la segunda cantidad a emplear, se tomó un valor por debajo del anteriormente establecido (2.10 g), específicamente la mitad (1.05 g/4 L de mosto), diferenciándose así la segunda cantidad empleada como 0.26 g de L-arginina/L de mosto (ver Apéndice A).

#### **4.3. Determinar el efecto de la concentración de la L-arginina sobre el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja**

Los aspectos que se presentan a continuación, se determinaron con el fin de comprobar el efecto de la L-arginina en las reacciones químicas que intervienen en el proceso de fermentación alcohólica de la miel de abeja.

#### 4.3.1. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características fisicoquímicas de los productos resultantes, en función del tiempo

Seguidamente a la preparación de los mostos, fueron medidos, mediante el hidrómetro, los grados Brix y las densidades de los mismos (día 0). Posterior a la inoculación, la adición de L-arginina a dos de los sustratos y al acondicionamiento de los botellones de vidrio, cada tres días fueron medidas las mismas características fisicoquímicas ( $^{\circ}$ Bx y densidad) en los tres hidromieles.

##### 4.3.1.1. Seguimiento de los grados Brix

Esta propiedad fue seguida en un intervalo de tiempo constante (cada tres días, a la misma hora), para verificar que, los azúcares que contenía la miel en primera instancia, fueran transformándose en etanol a lo largo del tiempo, por medio del desempeño de las levaduras; de modo que, los datos tomados mediante el hidrómetro Chefast, fueron registrados en la Tabla 4.7 y representados gráficamente en la Figura 4.1.

Tabla 4.7. Grados Brix de los mostos e hidromieles

Muestra	A	B	C
Día	$^{\circ}$ Bx	$^{\circ}$ Bx	$^{\circ}$ Bx
0	28.00	28.00	28.00
3	23.70	19.20	17.00
6	19.20	14.70	7.50
9	14.70	10.00	5.10
12	12.30	7.50	2.50
15	10.00	5.10	2.50
18	7.50	5.10	---
21	5.10	2.50	---
24	5.10	2.50	---
27	2.50	---	---
30	2.50	---	---

De la tabla 4.7, se aprecia el descenso del contenido inicial de °Bx de los mostos a través del monitoreo de este durante la fermentación primaria, detectándose un rápido descenso inicial, el cual fue variando en función de los hidromieles.

Se observó un comportamiento similar al obtenido por Vidrih y Hribar (2007), donde la transformación de azúcares en etanol produjo una disminución en los sólidos solubles. A su vez, Queris (2010) indica que la fermentación alcanza su etapa final alrededor de un nivel de 4 °Bx.

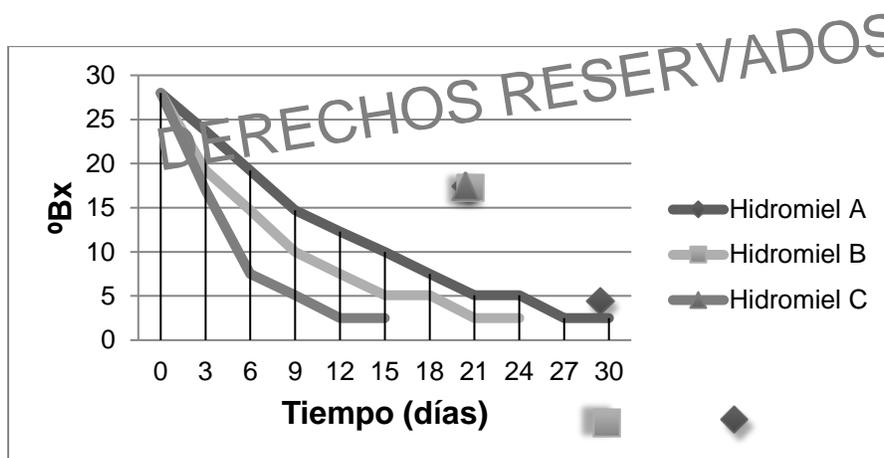


Figura 4.1. Cambio de °Bx de los mostos, durante la fermentación

En primera instancia, se puede observar en la Figura 4.1 que el comportamiento de las tres rectas, correspondientes a los grados Brix de cada hidromiel, es decreciente. Este comportamiento responde a lo establecido por Blanco et al. (2012), y es debido a que, en la fermentación alcohólica de la miel es necesaria la transformación de los azúcares presentes, lo cual provoca una disminución en el nivel de sólidos solubles, y el aumento del grado alcohólico.

El hidromiel C (2.10 g de L-arginina), presentó una tasa de descenso inicial de aproximadamente 11 °Bx los primeros seis días, luego el descenso fue más leve, con una tasa de 2.50 °Bx, estabilizándose en ese valor alrededor del día 12 del proceso, y se mantuvo constante durante tres días más (hasta el día 15),

indicando así el final de la primera fermentación.

El nivel de grados Brix del hidromiel B (1.05 g de L-arginina), fluctuó presentando una tasa de descenso de 8.80° durante los primeros tres días, la cual descendió aproximadamente 4.6° hasta el día 9. De forma que, el nivel de grados Brix se redujo a 5.10° para el día 15, valor que se hizo constante hasta alrededores del día 18 y luego descendió a 2.50°, hasta estabilizarse en el día 21.

El comportamiento del hidromiel B, es una muestra de la inhibición del sustrato existente en este ensayo, donde la levadura no logró desarrollar toda su capacidad de transformación de azúcares, lo cual le hizo tener una fase de adaptación un poco más larga, en comparación con el C.

Por otro lado, el hidromiel A (0 g de L-arginina), mostró un corto período inicial de adaptación hasta alrededor del día 9, con una tasa de descenso de 4.40 °Bx. A partir de ese día, el descenso en el nivel de sólidos solubles fue muy leve, presentándose un constante y significativo descenso en la concentración de azúcares, donde el nivel de grados Brix descendió en una tasa de 2.4° por día, hasta estabilizarse el contenido de sólidos en 2.50° para el día 27.

Asimismo, el comportamiento del hidromiel A se asocia a la alta demanda de nutrientes de este sustrato, por parte del crecimiento exponencial experimentado por las levaduras en ese período. De acuerdo a Nielsen et al. (2003), la estabilización en la variación de este parámetro hasta el final de la primera fermentación, se asocia al momento final del ciclo de las levaduras, en el cual cesa su actividad de transformación de azúcares.

#### **4.3.1.2. Seguimiento de la densidad**

Esta característica fue medida, de forma constante, cada tres días, con el fin de

comprobar que mientras más alcohol esté presente en el sustrato de fermentación, este debe disminuir su densidad, conforme vayan convirtiéndose los azúcares. Los datos, medidos a través del hidrómetro, se registraron en la Tabla 4.8 y se representaron gráficamente en la Figura 4.2.

Tabla 4.8. Densidades de los mostos e hidromieles

Muestra	A	B	C
Día	$\rho$ (g/mL)	$\rho$ (g/mL)	$\rho$ (g/mL)
0	1.12	1.12	1.12
3	1.10	1.08	1.07
6	1.08	1.06	1.03
9	1.06	1.04	1.02
12	1.05	1.03	1.01
15	1.04	1.02	1.01
18	1.03	1.02	---
21	1.02	1.01	---
24	1.02	1.01	---
27	1.01	---	---
30	1.01	---	---

De la Tabla 4.8, se observa que el valor de la densidades iniciales de los mostos, 1.12 g/mL (día 0), cumple con ser más denso que el agua (0.99713 g/mL), y menos denso que la miel (1.43 g/mL).

Asimismo, la transformación de los azúcares en etanol durante la fase estacionaria, produjo una disminución en las densidades de los mostos durante los días de fermentación primaria.

Para el hidromiel C (2.10 g de L-arginina), el descenso fue rápido, disminuyendo en una tasa de 0.05 g/mL para el tercer día de fermentación; 0.04 g/mL para el sexto día y posteriormente, 0.01 g/mL hasta obtener 1.01 g/mL de densidad constante, para alrededores del día doce.

Por otra parte, el hidromiel B (1.05 g de L-arginina), presentó una tasa descenso inicial de 0.04 g/mL para el tercer día de fermentación primaria, siendo esta la tasa máxima que alcanzó. Luego, esta disminuyó 0.02 g/mL hasta el noveno día; y por último, logró una tasa de descenso constante de 0.01 g/mL, hasta disminuir la densidad al valor de 1.01 g/mL, en el día 21.

La densidad inicial del hidromiel A (0 g de L-arginina), descendió constantemente en una tasa de 0.02 g/mL (tasa máxima alcanzada) hasta el día 9; luego, esta se redujo a 0.01 g/mL, valor que se mantuvo constante hasta el final de la fermentación en el día 27.

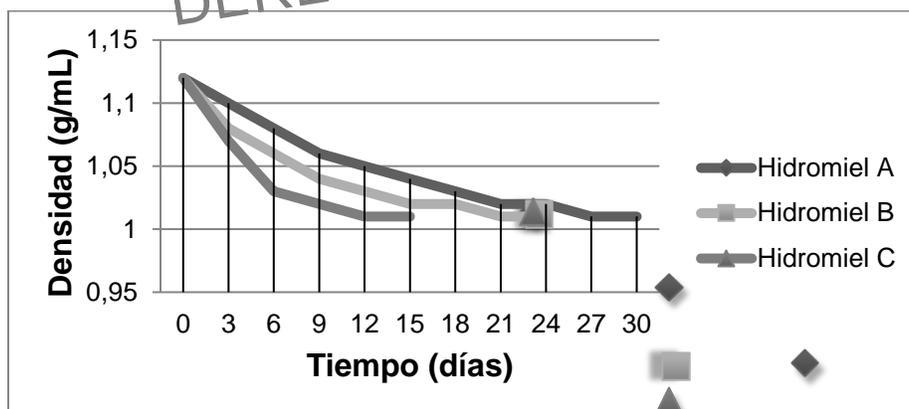


Figura 4.2. Cambio de la densidad de los mostos, durante la fermentación

De la Figura 4.2, se puede observar que el comportamiento es semejante al de los grados Brix (Figura 4.1), donde las tres rectas correspondientes a las densidades de cada hidromiel, son decrecientes. Este comportamiento, concuerda con lo establecido por la literatura (Blanco et al., 2012), y es debido a que, durante la fase inicial de la fermentación primaria, se produjo etanol en gran medida, el cual es menos denso que el mosto (día 0).

A su vez, los resultados correspondientes al descenso de la densidad inicial del hidromiel C fueron los más satisfactorios, ya que, el tiempo de fermentación de este fue disminuido en gran parte, en comparación con el A (hidromiel de control).

En cuanto al hidromiel B, a pesar de que en los primeros doce días de fermentación primaria hubo un descenso brusco en la cantidad de etanol, y por ende, una disminución en su densidad inicial, debido a que la cantidad de L-arginina adicionada a este hidromiel no fue la suficiente para acelerar por completo el proceso, este sufrió un agotamiento de nutrientes, en comparación con los requeridos por la levadura; lo cual se refleja en la gráfica, al no obtener un descenso significativo de la densidad, con respecto a los otros dos hidromieles.

Por otro lado, el hidromiel A, presentó una disminución leve y constante, la cual ocasionó que su proceso fermentativo fuese el más lento.

De manera general, se pudo observar que, el mayor cambio de las variables de seguimiento ( $^{\circ}\text{Bx}$  y densidad) se obtuvo en la primera semana. En cuanto al tiempo de fermentación, medido en días, que requirió cada hidromiel para culminar sus respectivas fermentaciones primarias, estuvo en función de la cantidad de nutrientes (L-arginina) adicionados a los sustratos de fermentación.

Para una concentración inicial de 28  $^{\circ}\text{Bx}$  y una concentración final de nitrógeno de 50 mg/L en los mostos, el tiempo de fermentación es reducido a 12 días para el hidromiel C, debido a la adición de 2.10 gramos de L-arginina a este sustrato, lo cual originó una población mayor de levaduras que transformarían los azúcares en etanol, de manera más rápida.

El hidromiel B, constó de 21 días para culminar, es decir, nueve días después del hidromiel C. Esto se debe a que a este sustrato se agregó 1.05 gramos de L-arginina, cantidad que no fue suficiente para acelerar por completo el proceso de fermentación.

Por otro lado, el hidromiel A (hidromiel de control, 0 gramos de L-arginina) tardó 27 días para culminar su período de fermentación primaria, ya que, a este sustrato no fue adicionada fuente nitrogenada alguna que serviría de nutriente para las

levaduras, por lo que, tomó el tiempo que tardaría en fermentar un hidromiel estándar (agua, miel y levadura).

Se puede afirmar que, con respecto al menor tiempo de fermentación (lo cual se traduce en menores costos de producción), el hidromiel C fue el que arrojó mejores resultados, ya que fue el producto cuya fermentación fue más rápida y lo constituye como el hidromiel más eficiente (contenido de la cantidad más adecuada de L-arginina, en función del tiempo de fermentación), en comparación con el hidromiel B, ya que este tardó 9 días más que el C para culminar su fermentación primaria.

DERECHOS RESERVADOS

#### **4.3.1.3. Determinación del grado alcohólico**

La evaluación del contenido alcohólico presente en los productos, es un parámetro de importancia en la selección del proceso. Por un lado, está en directa relación con el nivel de producción, que se refleja en el contenido de etanol final; además, se relaciona con la calidad del producto final, ya que, la presencia y concentración de determinadas especies influye en la aceptabilidad tanto sensorial, como legal.

La normatividad establece el valor de 6 % v/v como contenido mínimo de alcohol, para considerar una bebida tipo vino. Además, para el caso del hidromiel, diferentes estudios como el de Mendes-Ferreira et al. (2010), han demostrado que el valor promedio final de alcohol está alrededor de 10 % v/v. En esta oportunidad, se obtuvo un grado alcohólico de 14.18 % v/v (ver Apéndice B).

En cuanto al contenido de etanol, no se encontraron diferencias entre los hidromieles, ya que los tres alcanzaron el mismo grado de alcohol; esto se debe a que cada uno de ellos se estabilizó en 1.12 g/mL de densidad el día de la preparación de los mostos, para que los tres estuviesen en las mismas condiciones. De igual forma, estos culminaron sus fermentaciones primarias con

1.01 g/mL de densidad, valor constante en los tres hidromieles.

Al introducir ambos valores en la Ecuación 3.2 (proporcionada por el hidrómetro Chefast), arrojan el mismo contenido de alcohol para los hidromieles A, B y C.

Sin embargo, los sustratos con adición de L-arginina aumentaron la concentración de solutos en el medio (por el incremento en la concentración de nitrógeno), lo cual hizo su fermentación más rápida, diferenciándose por la cantidad de fuente nitrogenada adicionada, pero asumiendo un grado alcohólico igual.

#### **4.3.2. Determinación del efecto de la concentración de la L-arginina sobre las características sensoriales del hidromiel obtenido en el menor tiempo de fermentación, comparando con el obtenido sin la adición de la fuente nitrogenada (tiempo fermentativo estándar)**

Para la comparación sensorial de los hidromieles A y C, se tomó como población a la parroquia Altagracia, localizada en el municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. Según el Instituto Nacional de Estadística (I.N.E), dicha parroquia poseía una población de 55 377 habitantes para el año 2012.

Se entregó el test a 30 personas (ver cálculo de la muestra en Apéndice C), 15 hombres y 15 mujeres, cuyas edades fueron distribuidas equitativamente entre los rangos: 18 – 25 años, 26 – 35 años y 36 - 55 años, 10 personas (de ambos sexos), para cada rango, respectivamente.

Se leyó el contenido y se explicó, nuevamente, la información que se deseaba extraer: la comparación entre las características sensoriales del hidromiel cuyo tiempo de fermentación fue el menor (C, 2.10 g L-arginina) y el hidromiel de control, cuyo tiempo fermentativo fue el estándar (A, 0 g de L-arginina).

Luego, se aplicó el instrumento de acuerdo a los preparativos establecidos previamente y se convino también que cualquier comentario, fuera de los esperados en las preguntas, se registrarán al final para luego analizar posibles aportes no contemplados.

Del test se obtuvieron puntuaciones correspondientes a la comparación de las características sensoriales de ambos hidromieles. El instrumento requirió marcar con una X la elección de una de las cinco categorías presentadas, las cuales se incrementaban del 1 (menor) al 5 (mayor), cuya escala de intervalo fue la siguiente: 1 = muy inferior, 2 = inferior, 3 = igual, 4 = superior y 5 = muy superior.

Posteriormente, se ingresaron los datos obtenidos por el test en el programa Microsoft Excel. Se calcularon los promedios aritméticos, las modas y los porcentajes obtenidos en cada categoría, en función de las tres características sensoriales comparadas.

Los resultados de los promedios y modas correspondientes a las tres características comparadas, en forma general (sexo masculino, sexo femenino y considerando todas las puntuaciones en cada categoría), se encuentran expuestos en la Tabla 4.9, presentada a continuación.

Tabla 4.9. Promedios aritméticos y modas para los hidromieles A y C, de manera general

	Color	Aroma	Sabor
Promedio	3.47	3.73	4.03
Moda	4	5	5

De la Tabla 4.9 se observa que, en cuanto a color, el hidromiel C se encuentra dentro del rango correspondiente a las categorías: igual – superior (comparado con el A), con un promedio aritmético de 3.47. De la misma forma ocurrió con el

aroma, con un promedio de 3.73, valor decimal correspondiente al intervalo entre la puntuación número 3 (igual) y la número 4 (superior). Con respecto al sabor, se obtuvo un promedio de 4.03, lo que significa que los degustadores sintieron que el hidromiel C es superior al hidromiel A.

Los valores de las modas fueron: 4 para el color, y 5 para el aroma y el sabor, calificando al hidromiel C como un producto entre superior y muy superior al A, al tener una puntuación de 5 como el valor más repetido entre sus resultados. Por lo que, se concluye que el hidromiel C, a pesar de que fermentó en el menor tiempo (12 días), esto no influyó negativamente en sus características sensoriales, constituyéndolo como similar o incluso superior, al hidromiel de control (27 días).

La distribución general de las puntuaciones obtenidas en las cinco categorías u opciones de respuestas, en función de las tres características evaluadas (color, aroma y sabor de los hidromieles A y C), se encuentra plasmada en las siguientes figuras. En primer lugar, la Figura 4.3 representa gráficamente las puntuaciones resultantes de la comparación del color.

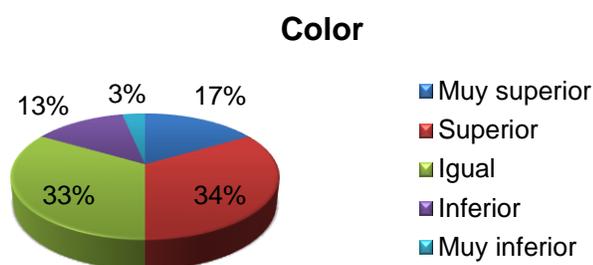


Figura 4.3. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al color

De la Figura 4.3, se observa que la puntuación predominante en el color fue la número 5 (superior), indicando que el hidromiel C era superior al A, a simple vista, con el 34 % de elecciones.

Seguidamente, se encuentra la puntuación número 3 (igual) con una diferencia de la primera en un punto, indicando que los hidromieles eran iguales o similares con un porcentaje de 33 %. Luego, está la puntuación de 5 (muy superior) con 17 %, seguida de la puntuación 2 (inferior) con 13 % y, por último, con 3 %, la puntuación de 1 (muy inferior).

Ahora bien, la representación gráfica de las puntuaciones del aroma para el hidromiel C, con respecto al A, mediante la Figura 4.4.

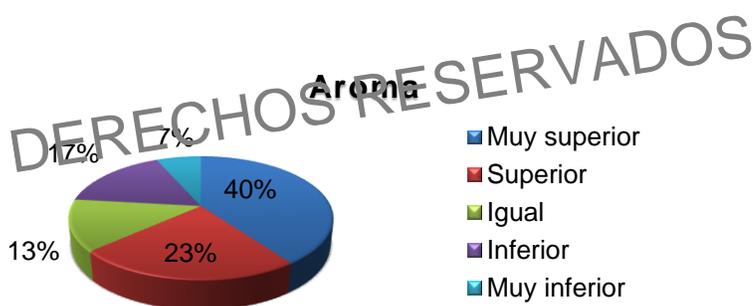


Figura 4.4. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al aroma

En la Figura 4.4 se muestra la distribución, en porcentajes, de las puntuaciones correspondientes a las cinco categorías presentadas en el test para el aroma. La puntuación predominante, con 40 %, fue la número 5 (muy superior), lo que significa que la mayoría de los degustadores percibieron el aroma del hidromiel C como muy superior, en comparación con el aroma del A. Seguidamente, se encuentra la puntuación número 4 (superior), con 23 %, indicando, de igual forma, que el aroma del hidromiel C fue superior, con respecto al A.

Luego, una pequeña parte de la muestra de la población puntuó el aroma del hidromiel C con el número 2 (inferior), constituyendo el 17 % de las puntuaciones. Igualmente, el 13 % señaló que los aromas eran similares, con el número 3. Por último, el 7 % de las puntuaciones correspondieron al número 1 (muy inferior), indicando que el aroma del hidromiel C fue muy inferior que el del A.

La Figura 4.5 representa gráficamente las puntuaciones, en cuanto al sabor.

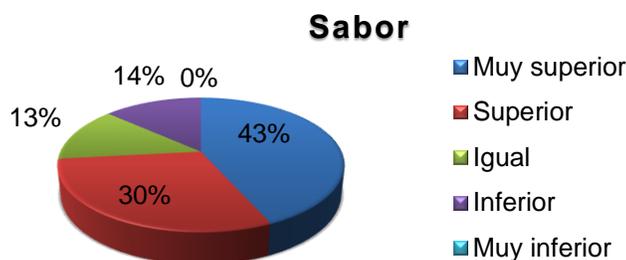


Figura 4.5. Porcentajes obtenidos en cada categoría, con respecto al sabor

De la Figura 4.5, se puede observar que el sabor obtuvo una puntuación predominante de 5 (muy superior), con el 43 %. Asimismo, se obtuvo un 30 % correspondiente a la puntuación número 4 (superior), indicando que el sabor del hidromiel C fue superior al del A. Seguidamente, se encuentra la puntuación número 2 (inferior) con el 14 %. Luego, está la puntuación número 3, con el 13 %, indicando igualdad de los sabores.

Cabe destacar que, la puntuación número 1 obtuvo 0 %, indicando que el hidromiel C no fue muy inferior que el A, en cuanto al sabor; por lo que, se puede afirmar que esta propiedad organoléptica no es afectada significativamente por la rápida fermentación debido a la adición de 2.10 g de L-arginina al hidromiel C.

Con respecto a la comparación sensorial realizada por los integrantes del sexo masculino, se realizaron los cálculos de los promedios y modas, cuyos resultados se registraron en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Promedios aritméticos y modas para los hidromieles A y C, del sexo masculino

	Color	Aroma	Sabor
Promedio	3.13	3.80	4.27
Moda	3	5	5

En el caso del sexo masculino (Tabla 4.10), las puntuaciones otorgadas para el color estuvieron dentro de las categorías 3 y 4, con un promedio de 3.13, indicando que en cuanto a la apariencia, ambos hidromieles eran iguales o similares, con una desviación de superioridad de 0.13 puntos.

El aroma también se ubicó entre las categorías 3 y 4, con un promedio de 3.80, identificando al hidromiel C como igual – superior que el A, en cuanto al impacto del aroma a alcohol. El sabor del hidromiel C fue calificado como superior – muy superior que el A, con un promedio de 4.27 (entre las categorías 4 y 5).

Para las modas, se obtuvieron como constantes puntuaciones de 5, para el aroma y el sabor. De la misma forma, los hombres colocaron repetitivamente la puntuación de 3 para el color.

Cabe destacar que, del sexo masculino fueron distribuidos, en cuanto a edades, de la siguiente forma: 10 hombres entre el rango de 18 – 25 años, 10 entre 26 – 35 años y 10 entre 36 – 55 años.

Por último, mediante las calificaciones del sexo femenino del hidromiel C, en comparación con el A, se hicieron los cálculos pertinentes, nuevamente, de los promedios aritméticos y modas, cuyos resultados están expuestos en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Promedios aritméticos y modas para los hidromieles A y C, del sexo femenino

	Color	Aroma	Sabor
Promedio	3.80	3.67	3.80
Moda	4	5	5

En la tabla 4.11 se reflejan las percepciones de las mujeres, indicando un

promedio de 3.80 para el color, valor que difiere del de los hombres en 0.67 puntos por encima, y calificando al hidromiel C como igual – superior que el A. En cuanto al aroma, se obtuvo 3.67, diferenciándose de la calificación de los hombres en 0.13 por debajo y calificando al hidromiel C como igual – superior. Para el sabor se obtuvo un promedio de 3.80, valor por debajo del establecido por los hombres con 0.47 puntos de diferencia. Se concluye que, la mayor diferencia entre el sexo masculino y femenino se obtuvo en cuanto a la percepción del color.

Asimismo, el puntaje más repetido para el aroma y sabor fue de 5 puntos, al igual que los hombres. Para el color, la moda fue de 4 puntos, puntaje más alto que el del sexo masculino.

El sexo femenino fue distribuido en cuanto a edades, de la misma forma que el masculino, es decir, 10 mujeres entre el rango de 18 – 25 años, 10 entre 26 – 35 años y 10 entre 36 – 55 años de edad.

## CONCLUSIONES

- Se verificó la pureza de la miel de abeja al comparar los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica con los valores establecidos por la literatura, encontrándose estos en correspondencia.
- La adición de la L-arginina a dos de los mostos permitió reducir el tiempo de fermentación en 6 días para el hidromiel B (1.05 g de L-arginina) y en 15 días para el C (2.10 g), con respecto al A (0 g).
- Se observaron pendientes decrecientes y pronunciadas correspondientes al seguimiento de los grados Brix y densidad, evidenciándose así una abundancia de nutrientes en los sustratos, durante los primeros 7 días de fermentación.
- El grado alcohólico final fue de 14.18 % v/v en los tres hidromieles, obtenido a partir de la elaboración de mostos con diluciones de miel en agua de 28 °Bx.
- Las características sensoriales de los hidromieles no fueron afectadas negativamente por la reducción de sus tiempos de fermentación, debido a la adición de la L-arginina a sus respectivos sustratos.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar distintas proporciones de miel/agua para el mosto de fermentación.
- Determinar el efecto de múltiples cepas de levaduras en la fermentación alcohólica de la miel de abeja.
- Comprobar el impacto de cantidades diferentes de L-arginina en el tiempo de fermentación.
- Emplear otros aminoácidos como fuentes de nitrógeno para el sustrato de fermentación.
- Evaluar el efecto del proceso de envejecimiento sobre las características sensoriales del hidromiel.
- Probar otros clarificantes en la eliminación de las partículas en suspensión de los hidromieles.
- Filtrar con otros mecanismos más eficientes, para una mejor retención de sólidos y homogeneización de los productos finales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, W. (2008). *La Naturaleza de la Investigación*. Caracas, Venezuela, Editorial: Biosfera, p. 55.
- American Mead Makers Association. (2001). *National Honey Board, Making Mead: The Art and the Science*. Recuperado el 11/02/2019 de <http://www.meadmakers.org>
- Ander-Egg, E. (1992). *Metodología de la investigación*. Ciudad de México, México. Editorial: Limusa, p. 57.
- Ander-Egg, E. (1997). *Introducción a las técnicas de investigación social*. Buenos Aires, Argentina. Editorial: Limusa, p. 33.
- Anon, A. (2005). Nova norma paulista para vinhaça, Norma Técnica CETESB. *Versao Janeiro, vol. 1* (núm 1, p. 231).
- Arias, F. (1999). *El proyecto de investigación*. Caracas, Venezuela. Editorial: Episteme, p. 53.
- Arias, F. (2006). *El proyecto de la investigación: Introducción a la Metodología Científica*, 5<sup>ta</sup> Ed. Caracas, Venezuela. Editorial: Episteme, p. 25, 26, 27, 376.
- Arias, F. (2012). *El proyecto de la investigación: Introducción a la Metodología Científica*, 6<sup>ta</sup> Ed. Caracas, Venezuela. Editorial: Episteme, p. 24.
- Baena, G. (1985). *Metodología de la investigación*. Ciudad de México, México. Editorial: Patria, p. 44.

- Balestrini, M. (2006). *¿Cómo se elabora el proyecto de investigación?*, 7ma Ed. Caracas, Venezuela. Editorial: BL Consultores Asociados, p. 131.
- Barbul, A. (1986). Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN*, vol. 10 (núm. 2, p. 227 – 238).
- Bartowsky, E. y Pretorius, I. (2009). Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, Springer-Verlag. *Berlin Heidelberg*, vol. 16 (núm. 11, p. 209 – 231).
- Bartra, E., Casado, M., Carro, D. y Campama, C. (2010). Differential expression of thiamine biosynthetic genes in yeast strains with high and low production of hydrogen sulfide during wine fermentation. *Journal of applied microbiology*, vol. 2 (núm. 109, p. 272 – 281).
- Baudar, P. (2018). *The Wildcrafting Brewer*. Chelsea, Estados Unidos. Editorial: Chelsea Green Publising, p. 64, 65, 72, 86, 312, 313.
- Bavaresco, A. (2006). *Proceso metodológico en la investigación: Cómo hacer un Diseño de Investigación*, 5ta Ed. Maracaibo, Venezuela. Editorial: EDILUZ, p. 63 - 65.
- Bavaresco, A. (2008). *Las técnicas de investigación: Manual para la elaboración de tesis, monografías e informes*. Maracaibo, Venezuela. Editorial: Universitaria, p. 23.
- Bely, J. y Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol.1. (núm. 70, p. 246 – 252).

- Benito, P. (2013). *Clasificación de las levaduras del vino*. Recuperado el 08/02/2019 de <http://urbinavinos.blogspot.com/2013/01/clasificacion-de-las-levaduras-del-vino.html>
- Bertello, P. (2001). *Hidromiel: de la miel y el vino*. Recuperado el 04/02/2019 de <http://www.revistainterforum.com/espanol/articulos/051402Naturalmente.html>.
- Blanco, A., Quicazán, M. y Cuenca, M. (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. *Vitae*, vol. 19 (núm. 1, p. 234 – 236).
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L. y Kunkee, R. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. Utah, Estados Unidos. Editorial: Chapman & Hall, p. 43 – 44.
- Carretero, F. (2012). *Innovación tecnológica en la industria de bebidas*. Recuperado el 20/01/2019 de [https://www.academia.edu/29370739/INNOVACIÓN\\_TECNOLOGICA\\_EN\\_LA\\_INDUSTRIA\\_DE\\_BEBIDAS\\_Francisco\\_Carretero\\_Casado\\_PARTE\\_1\\_Procesos\\_de\\_fabricacion\\_de\\_bebidas\\_alcoholicas](https://www.academia.edu/29370739/INNOVACIÓN_TECNOLOGICA_EN_LA_INDUSTRIA_DE_BEBIDAS_Francisco_Carretero_Casado_PARTE_1_Procesos_de_fabricacion_de_bebidas_alcoholicas)
- Castro, F. (2013). *Técnicas e instrumentos de recolección de datos*. Recuperado el 28/02/2019 de <https://bloquemetodologicodelainvestigacionudo2010.wordpress.com/tecnicas-e-instrumentos-de-recoleccion-de-datos/>
- Cerda, H. (2005). *Los elementos de la investigación. Cómo reconocerlos, diseñarlos y construirlos*. Bogotá, Colombia. Editorial: El Búho LTDA, p. 68.
- Cervo, A. y Bervian, P. (1989). *Metodología científica*. Bogotá, Colombia.

Editorial: McGraw-Hill, p. 41.

Chávez, N. (1994). *Proceso y producto en la investigación documental*. Recuperado el 25/02/2019 de <http://virtual.urbe.edu/tesispub/0073962/cap03.pdf>

Cheng, Y., Du, Z., Zhu, H., Guo, X. y He, X. (2016). Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. *Scientific Reports*, vol. 6 (núm. 31, p. 1 – 12).

Codex Alimentarius Commission Standards. (2001). Codex standards for honey. *FAO-Rome*, vol. 1 (núm, 3, p.1 – 7).

Cooper, T. (1982). *Nitrogen metabolism, the molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Londres, Inglaterra. Editorial: FEMS, p. 55 - 56.

Cotte, H., Casablanca, S., Chardon, J. y Lheritier., G. (2003). Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, vol. 5 (núm. 1021, p. 145 – 155).

Cramer, A., Vlassides, S. y Block, D. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 1 (núm. 77, p. 49 – 60).

Crane, E. (1975). *Índice de refracción de mieles de diferentes contenidos de agua*. Recuperado el 05/02/2019 de [https://apicultura.fandom.com/wiki/Humedad\\_en\\_miel](https://apicultura.fandom.com/wiki/Humedad_en_miel)

Crane, E. (1980). *A book of honey*. Oxford, Estados Unidos. Editorial: Oxford Paperbacks, p. 150 – 157.

- Creswell, J. (2005). *Educational research: Planning, conducting and evaluating quantitative & qualitative research*, 2da Ed. Nueva Jersey, Estados Unidos. Editorial: Pearson Education, Inc, p. 44.
- Dickinson, J. y Sweiser, M. (2003). *Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, 2da Ed. Londres, Inglaterra. Editorial: First Reads, p. 231 – 235.
- Duarte, M., Espinosa, L., Díaz, M. y Sánchez, R. (2008). Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Med Int Mex*, vol. 24 (núm. 6, p. 397 – 406).
- Escudero, A., Gogorza, B., Melús, M., Ortín, N., Cacho, J. y Ferreira, V. (2004). Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52 (núm. 11, p. 3516 – 3524).
- Finola, M., Lasagno, M. y Marioli, J. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, vol 2. (núm. 100, p. 1649 – 1653).
- Fundación para el Desarrollo Apícola, Fundapi. (2015). *La comercialización de la miel en Venezuela*. Recuperado el 19/01/2019 de <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/1142-comercializacion-miel-venezuela>
- Fundación para la Innovación Agraria, FIA. (2008). *Agricultura colombiana y venezolana*. Recuperado el 19/01/2019 de <http://www.fia.cl/wp-content/uploads/2018/03/Memoria-FIA-2016.pdf>
- García, J. (2015). *¿Qué es la fermentación alcohólica?*. Recuperado el 12/02/2019

de <http://www.garciacarrion.es/es/vinos-garcia-carrion/pregunta-al-enologo/que-es-la-fermentacion-alcoholica>

Garza, E. (1988). *La investigación documental: Características principales*. Recuperado el 22/02/2019 de <https://www.google.co.ve/amp/s/www.lifeder.com/investigacion-documental/amp/>

Gilliam, M. y Prest, D. (1978). Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Pathol*, vol 1 (núm. 49, p. 70 – 75)

Godoy, L., Herrera, P. y Caicedo, L. (1987). *Principios de Ingeniería bioquímica*. Bogotá, Colombia. Editorial: Sandré, p. 23 - 25.

Gran Diccionario de la Lengua Española. (2016). *Miel*. Recuperado el 11/02/2019 de <https://es.thefreedictionary.com/miel>

Guerrero, S., Montoya, R. y Hueso, C. (2014). *Diseño documental*. Recuperado el 24/02/2019 de [http://www.ujaen.es/investiga/tics\\_tfg/dise\\_documental.html](http://www.ujaen.es/investiga/tics_tfg/dise_documental.html)

Henschke, P., Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C. y Francis, I. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice - Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, vol. 127 (núm. 3, p. 1072 – 1083).

Hernández, D. (1999). *Efecto de un cultivo de Saccharomyces cerevisiae en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados con pasto ovillo (Dactylis glomerata) cosechado a dos intervalos de rebrote*. Montecillo, México. Tesis de maestría en ciencias, Colegio de Postgraduados, p. 74.

- Hernández, E., Maza, E. y Lozano, N. (2003). Producción de proteína unicelular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteínizado. *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 5 (núm 2. p. 468 – 477).
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2006). *Metodología de la investigación*, 5<sup>ta</sup> Ed. Ciudad de México, México. Editorial: McGraw-Hill, p. 117.
- Howell, G. (2011). Yeast nutrition and successful fermentations. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, vol. 1 (núm. 573, p. 101 – 102).
- Hurtado, A. (2000). *Técnicas e instrumentación para la recolección de datos*. Recuperado el 29/02/2019 de <http://www.eumed.net/tesis-doctorales/2010/prc/INSRUMENTOS%20DE%20RECOLECCION%20DE%20DATOS.htm>
- Ibarra, B., Cortes, C. y Botero, J. (2010). *Ingeniería de Tequilas*. Bogotá, Colombia. Grupo de Investigación en ingeniería institucional, p. 79.
- Ilha, E., Bertoldi, F., Acastio dos Reis, V. y Corumbá, E. (2008). Alcoholic fermentation yield and efficiency from honey wine production. *Boletín de pesquisa e desenvolvimento*, vol 1. (núm 82, p. 11).
- Ilha, E., Torres, R., Porto, A., y Meinert, E. (2000). Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production at laboratory scale. *Acta Científica Venezolana*, vol. 1 (núm. 51, p. 231 – 235).
- Instituto Nacional de Estadística, INE (2012). *Poblaciones del municipio Miranda*. Recuperado el 30/07/2019 de [https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es\\_ES&c=Page&cid=1254735910183&p=](https://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=Page&cid=1254735910183&p=)

1254735910183&pagename=INE%2FINELayout

Jiménez-Martí, E. y Del Olmo, M. (2007). Addition of ammonia or amino acids to anitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS*, vol. 1(núm. 8, p. 245 – 256).

Kaskonienè, V. y Venskutonis, P. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 1 (núm. 9, p. 620 – 634).

Korkman, M. (1998). *Manual for the NEPSY*. Texas, Estados Unidos. Editorial: Trills, p. 60 - 61.

Lamonthe-Abiet, LA. (2007). *Solutions for wine making: LA Bayanus*. Recuperado el 10/02/2019 de [https://www.lamothe-abiet.com/images/stories/telechargement/Fiches-commerciales/FC-espagnol/FC\\_ES\\_LA\\_BAYANUS.pdf](https://www.lamothe-abiet.com/images/stories/telechargement/Fiches-commerciales/FC-espagnol/FC_ES_LA_BAYANUS.pdf)

Lee, W., Janson, P. y Brew, C. (1996). *Propiedades de las levaduras*. Florida, Estados Unidos. Editorial: Storey Publishing, p. 155.

López, P. (2004). *Metodología de la investigación: Población y muestra*. Recuperado el 05/03/2019 de <http://metodologiaeninvestigacion.blogspot.com/2010/07/poblacion-y-muestra.html?m=1>

Manyi-Loh, C., Ndip, R. y Clarke, A. (2011). Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 1 (núm. 12, p. 9514 – 9532).

- Mata, M. (1997). *Población, muestra y muestreo*. Recuperado el 06/03/2019 de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1815-02762004000100012](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1815-02762004000100012)
- Mayo Clinic Foundation (2018). *Propiedades de la L-arginina*. Recuperado el 12/02/2019 de <https://www.mayoclinic.org/es-es/drugs-supplements-l-arginine/art-20364681>
- McConnell, D. y Schramm, K. (1995). Mead success: ingredients, processes and techniques. *Zymurgy Spring*, vol 4 (núm. 1, p. 33 - 39).
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Ines, A. y Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 1 (núm. 144, p. 193 – 198).
- Méndez, C. (2001). *Metodología: Diseño y desarrollo del proceso de investigación*, 3ra Ed. Barranquilla, Colombia. Editorial: McGraw- Hill, p. 47.
- Ministerio de Agricultura y Tierras. (2002). *Estadísticas Agrícolas*. Recuperado el 18/01/2019 de <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/1142-comercializacion-miel-venezuela>
- Miró, J. (1944). *Estrategia de la investigación descriptiva*. Recuperado el 25/02/2019 de <https://noemagico.blogia.com/2006/091301-la-investigaci-n-descriptiva.php>
- Morales, E., Alcarde, V. y Angelis, D. (2013). Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (LALVIN K1-1116). *African Journal of Biotechnology*, vol.12 (núm. 2, p. 199 – 204).

- Muguirra, A. (2018). *La escala de Likert y cómo utilizarla*. Recuperado el 28/02/2019 de <https://www.google.com.ve/amp/s/www.questionpro.com/blog/es/que-es-la-escala-de-likert-y-como-utilizarla/>
- Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R. y Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quim. Nova*, vol. 30 (núm. 4, p. 848 – 851).
- Navascués, E. (2014). *Nutrición orgánica en fermentación alcohólica*. Recuperado el 20/01/2019 de <http://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/220149-nutricion-organica-en-fermentacion-alcoholica-es-imprescindible-para-calidad-de-vinos.html>
- Navrátil, M., Sturdík, E. y Gemeiner, P. (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilized, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology letter*, vol. 2 (núm 23, p. 977 – 982).
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles*. Nueva York, Nueva York. Editorial: Plenum Publishers, p. 203 - 206.
- Noticias Apícolas (2010). *Ministerio de Agricultura y Tierra*. Monagas, Venezuela, p. 32.
- Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol, 37 (núm. 1, p. 84 – 96).
- O'Connor, I. y Cox, W. (1991). Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 1 (núm 7, p. 89 – 96).

- Olivares, A. (2015). *Nutrición Sin Más*. Recuperado el 19/01/2019 de <https://nutricionsinmas.com/>
- Parella, S. y Martins, F. (2010). *Metodología de la investigación cualitativa*, 2da Ed. Caracas, Venezuela. Editorial: FEDUPEL, p. 87.
- Pereira, A., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E. y Estevinho, L. (2009). Mead production: selection and characterization assays of *Sacharomyces cerevisiae* strains. *Food and chemical toxicology*, vol. 1 (núm. 47, p. 2057 – 2063).
- Pereira, A., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J., Estevinho, L. y Mendes-Faia, A. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization on mead production. *Food Science and Technology*, vol. 1 (núm. 56, p. 21 – 30).
- Pereira, O., Mendes-Ferreira, E. y Mendes-Faia, O. (2017). *Mead and other fermented beverages*. Lisboa, Portugal. Editorial: Alto Douro, p. 2.
- Pereira, A., Mendes-Ferreira, J., Oliveira, L., Estevinho, M., Mendes-Faia, A. (2015). Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 1 (núm. 121, p. 122 – 128).
- Pérez, H. (2007). *Evaluación y selección de cepas de levaduras con características probióticas para uso como aditivo alimentario*. La Habana, Cuba. Tesis presentada en opción del Título Académico de Maestro en Ciencias Microbiológicas, mención en Fermentaciones, p. 42 – 61.
- Pérez, J. y Gardey, A. (2008). *Definición de relaciones interpersonales*. Recuperado el 29/02/2019 de <https://definicion.de/relaciones-interpersonales/>

- Persano, O. y Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, vol. 1 (núm. 35, p. S38 - S81).
- Pineda, B., De Alvarado, E. y De Canales, F. (1994). *Metodología de la investigación, manual para el desarrollo de personal de salud*, 2da Ed. Washington, Estados Unidos. Editorial: Panamericana de la Salud, p. 88.
- Queris, J. (2010). *Memorias curso fermentación de vinos y vinagres de fruta*. Bogotá, Colombia. Editorial: Andrade, p. 55 – 60.
- Querol, A. (2003). Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Microbiol*, vol. 1 (núm. 6, p. 201 – 205).
- Raffino, M. (2018). *Investigación no experimental*. Recuperado el 26/02/2019 de <https://concepto.de/investigacion-no-experimental/>
- Ramírez, T. (2010). *¿Cómo hacer un proyecto de investigación?*. Caracas, Venezuela. Editorial: Panapo, p. 33.
- Riegel, E. y Kent, J. (2003). *Riegel's Handbook of Industrial Chemistry*. Nueva Jersey, Estados Unidos. Editorial: Springer Verlag, p. 301.
- Robinson, A., Boss, P., Heymann, H., Soloman, P. y Trengove, R. (2011). Influence of yeast strain, canopy management, and site on the volatile composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines from Western Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59(núm. 1, p. 3273 – 3284).
- Robles, D. (2019). *Investigación documental, definición y objetivos*. Recuperado el 25/02/2019 de <https://investigacioncientifica.org/que-es-la-investigación-documental-definicion-y-objetivos/>

Rodríguez, F. (2005). *Las maravillas de la colmena: hidromiel y vinagre de miel*.

Recuperado el 25/01/2019 de <http://lafamiliapicola.blogspot.com/2011/01/>

[.las-maravillas-de-la-colmena-hidromiel.html?m=1](http://lafamiliapicola.blogspot.com/2011/01/.las-maravillas-de-la-colmena-hidromiel.html?m=1)

Roldán, A., Muiswinkel, G., Lasanta, C. y Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: physicochemical and sensory characteristics.

*Food Chemistry*, vol. 2 (núm. 126, p. 574 – 582).

Roldán, S. (2004). *Determinación de un hidromiel patrón en escalas piloto y semi-piloto*. Santiago de Chile, Chile. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Químico, p. 33.

Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B. y Salmon, J. (2003). Oxygen consumption by anaerobic *Sacharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 1 (núm. 69, p. 113 – 121).

Sabino, C. (1992). *El proceso de investigación*. Caracas, Venezuela. Editorial: Panapo, p. 43.

Sabino, C. (2002). *Proyecto de investigación*, 2da Ed. Caracas, Venezuela. Editorial: Episteme, p. 34.

Sablayrolles, J., Dubois, C., Manginot, C. y Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 82 (núm. 4, p. 377 – 381).

Sablayrolles, J. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: current situation and prospect. *Food Research International* vol. 1 (núm. 42, p. 418).

- Salamanca, G., Henao, C., Moreno, G. y Luna, A. (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. *Tolima*, vol. 1 (núm. 1, p. 1 - 3).
- Salinas, E. (2014). *NutriResponse: ¿Qué es la arginina?*. Recuperado el 10/02/2019 de <https://www.nutriresponse.com/blog/que-es-la-arginina/>
- Seo, J. (2005). Nature. *Biotechnol*, vol. 1 (núm. 23, p. 63 – 68).
- Smyth, H. y Cozzolino, D. (2013). Instrumental methods (spectroscopy, electronic nose, and tongue) as tools to predict taste and aroma in beverages: advantages and limitations. *Chemical Reviews*, vol. 113 (núm. 3, p. 1429 – 1440).
- Sroka, P. y Tuszynski, T. (2007). Changes in organic acids contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, vol. 1 (núm. 104, p. 1250 – 1257).
- Suescún, L. y Vit, P. (2006). Control de calidad de la miel de abejas producida como propuesta para un proyecto de servicio comunitario obligatorio. *Fuerza farmacéutica*, vol. 1 (núm. 1, p. 81 – 82).
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P. y Pretorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 1 (núm. 11, p. 139 – 173).
- Tamayo, M. (2003). *Procesos de la investigación científica: Fundamentos de la investigación con manual de evaluación de proyectos*, 5<sup>ta</sup> Ed. Ciudad de México, México. Editorial: Limusa, p. 193.
- Tamayo, M. (2009). *El proceso de la investigación científica*, 6<sup>ta</sup> edición. Ciudad de México, México. Editorial: Limusa, p. 61.

- Tomasso, M. (2004). *Tolerancia de las levaduras al etanol*. Montevideo, Uruguay. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Químico, p. 15 – 16.
- Ugliano, M., y Henschke, P. (2009). Yeasts and wine flavour, in: M.V. Moreno-Arribas, M.C. *Wine Chemistry and Biochemistry*, vol. 2 (núm. 1, p. 313 – 392).
- Valdebenito, S., Valdebenito, R., Díaz, P., Riveros, E., Bru La Brosse, I., Torres, R., Arredondo, C., Romero, J., Gutiérrez, B. y Figueroa, J. (2006). Evaluación Técnica y Económica de la elaboración de vino de miel de alta calidad (hidromiel), como alternativa de producción, comercialización y consumo como actividad sustentable, incorporando valor agregado a la miel producida en la VI región. *Santana*, vol. 12 (núm. 2, p. 120 – 178).
- Vidal, R. (1983). *Comportamento de Coleta do "Mel de cana" por abelhas do gênero Apis*. Sao Paulo, Brasil. Tesis de maestría en Ingeniería Química, p. 21 – 29.
- Vidrih, R. y Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, vol. 36 (núm. 2, p. 151 – 162).
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A. y Oliveira, J. (2010) Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*, vol. 95 (núm. 1, p. 240 – 246).
- Vilanova, M. y Oliveira, J. (2012). Application of gas chromatography on the evaluation of grape and wine aroma in Atlantic viticulture (NW Iberian Peninsula), in: B. Salih, O. Celikbicak (Eds.), *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. *InTech*, vol. 1 (núm. 1, p. 109 – 146).

- Walker, G. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. Arkansas, Estados Unidos. Editorial: John Wiley and Sons, p. 14.
- Weston, G. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey. *Food Chemistry*, vol. 1 (núm. 71, p. 235 – 239).
- White, J. (1975). *Composition of honey*. Londres, Inglaterra. Editorial: Heinemann, p. 29 – 71.
- Williamson, K. (2017). *Hidromieles y vinos caseros*. Santiago de Chile, Chile. Editorial: Pachamista, p. 3, 4, 5, 18, 19.
- Willix, P., Molan, C. y Harfoot, G. (1992). A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *Journal of applied bacteriology*, vol. 1 (núm. 73, p. 388 – 394).
- Wintersteen, C., Andrae, L. y Engeseth, N. (2005). Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of Food Science*, vol 1 (núm. 2, p. 119 – 126).
- Zoecklein, B., Fugelsang, K., Gump, B. y Nury, F. (2001). *Análisis y producción de vino*. Zaragoza, España. Editorial: Nadiam, p. 67 – 68.

## ANEXOS

### Anexo 1. Test de preferencia

#### Comparación de los hidromieles, según el público consumidor

Por favor, marque con una X el rango de edad y el sexo que lo representan:

**Edad:** 18 – 25 años: \_\_\_\_

**Sexo:** M: \_\_\_\_

26 – 35 años: \_\_\_\_

36 – 55 años: \_\_\_\_

A continuación, se le presentarán dos muestras (A y C) correspondientes a una bebida resultante de la fermentación alcohólica de la miel de abeja, llamada hidromiel.

Posterior a la degustación de las muestras A y C, por favor, indique con una X su opinión del hidromiel C con respecto al hidromiel A, considerando las siguientes características: color, aroma y sabor, empleando una escala de cinco puntos donde “muy superior” corresponde a la puntuación máxima y “muy inferior” corresponde a la puntuación más baja posible.

Las tres características evaluadas se normalizaron en función de los atributos de un vino blanco, el cual sirve de referencia para el hidromiel. Se pretende comparar ambos productos a través de cada una de ellas, por lo que, se desea extraer la siguiente información:

#### COLOR

Si considera que la muestra C tiene una mejor apariencia que la A, en cuanto a la claridad del hidromiel, coloque una puntuación alta (muy superior o superior, según su criterio). De lo contrario, si considera que el hidromiel C presenta una gran cantidad de partículas en suspensión (turbidez), a diferencia del hidromiel A, coloque una puntuación baja (inferior o muy inferior).

Si considera que ambas muestras lucen de forma semejante, marque con una X la casilla correspondiente a la opción “igual”.

### AROMA

Si considera que el aroma a alcohol de la muestra C es más intenso que la A, marque una puntuación alta (muy superior o superior). De lo contrario, coloque una puntuación baja (inferior o muy inferior).

Si considera que ambas muestras presentan aromas similares, marque con una X la casilla correspondiente a la opción "igual".

### SABOR

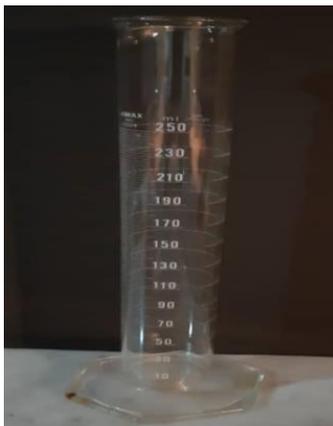
Si considera que el dulzor de la muestra C es menor que el de la A, coloque una puntuación alta (muy superior o superior). De lo contrario, si considera que el dulzor de la muestra C es mayor al de la A, coloque una puntuación baja (inferior o muy inferior).

Si considera que ambas muestras presentan sabores similares, marque con una X la casilla correspondiente a la opción "igual".

**Por favor, tómesese el tiempo de dar respuesta al siguiente test, de acuerdo a las instrucciones previamente descritas.**

C - A	Color	Aroma	Sabor
Muy superior			
Superior			
Igual			
Inferior			
Muy inferior			

Anexo 2. Cilindro graduado de 250 mL, marca Pyrex



Anexo 3. Balanza analítica digital, marca Ohaus



Anexo 4. pHmetro, marca Oaklon



Anexo 5. Refractómetro manual, marca ABBE Bausch &amp; Lomb



Anexo 6. Hidrómetro, marca Chefast



Anexo 7. Escala del hidrómetro

**Chefast**

**CONVERSION TABLE**

Sp. Gr. (@60°F)	Approx. %ABV	Brix (@60°F)
0.980	2.5	5.3
0.985	2.0	3.9
0.990	1.8	2.6
0.995	-0.7	-1.3
1.000	0.0	0.0
1.005	0.7	1.3
1.010	1.3	2.5
1.015	2.0	3.8
1.020	2.6	5.1
1.025	3.3	6.3
1.030	3.9	7.5
1.035	4.6	8.7
1.040	5.2	9.9
1.045	5.9	11.2
1.050	6.5	12.3
1.055	7.2	13.5
1.060	7.8	14.7
1.065	8.5	15.8
1.070	9.1	17.0
1.075	9.8	18.1
1.080	10.4	19.2
1.085	11.1	20.4
1.090	11.7	21.5
1.095	12.4	22.6
1.100	13.0	23.7
1.105	13.7	24.8
1.110	14.3	25.8
1.115	15.0	26.9
1.120	15.6	28.0
1.125	16.3	29.0
1.130	16.9	30.1
1.135	17.6	31.1
1.140	18.3	32.1
1.145	18.9	33.2
1.150	19.6	34.2

Anexo 8. Miel de abeja



DERECHOS RESERVADOS

Anexo 9. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ex-bayanus), marca LALVIN



REHYDRATE AHEAD OF USE  
HIDRATAR ANTES DE USARSE

40° - 43°C  
104° - 109°F

50 mL  
(2 oz)  
WATER  
EAU  
AGUA

00:15

MUST  
MOÛT  
MOSTO

KEEP REFRIGERATED  
CONSERVER AU RÉFRIGÉRATEUR  
MANTENER REFRIGERADO

Ingredients: Yeast, emulsifier  
Ingrédients : Levure, émulsifiant  
Ingredientes: Levadura, emulsificador

In Australia, imported by  
Lallemand Australia Pty Ltd  
23-25 Erudina Ave  
Edwardstown, SA, 5039

Produced for  
Produit pour  
Producido para  
**LALLEMAND INC.**  
MONTREAL, QC, CANADA  
H1W 2N8

0 67031 00011 9

Anexo 10. L-arginina en polvo, marca Nutricost



Anexo 11. Preparación de los mostos



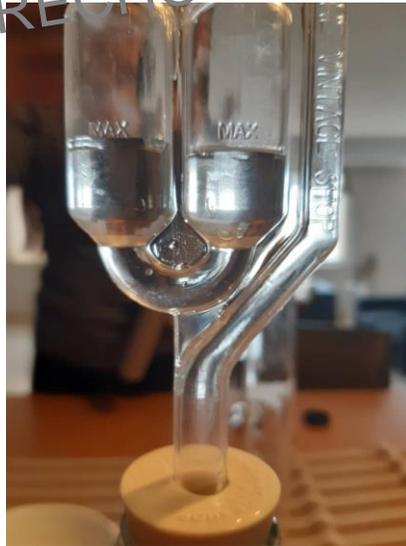
Anexo 12. Sustratos de fermentación





Anexo 13. Trampas de aire

DERECHOS RESERVADOS



Anexo 14. Fermentación primaria



Anexo 15. Medición de grados Brix y densidad



Anexo 16. Biomasa



Anexo 17. Fermentación secundaria



Anexo 18. Hidromieles clarificados y filtrados



Anexo 19. Muestras de los hidromieles A y C facilitadas a los degustadores



Anexo 20. Degustadores durante la comparación sensorial





Anexo 21. Producto final

DERECHOS RESERVADOS



## APÉNDICES

### Apéndice 1. Obtención de los gramos de L-arginina

$$\frac{50 \text{ mg N}}{\text{L mosto}} \times \frac{1 \text{ mmol C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2}{14.007 \text{ mg N}} \times \frac{1 \text{ mmol C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2}{4 \text{ mmoles N}} \times \frac{174.2 \text{ mg C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2}{1 \text{ mmol C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2}$$

$$\times \frac{\frac{1.3514 \text{ g inóculo S.c}}{\text{L de mosto}}}{\frac{0.4 \text{ g inóculo S.c}}{\text{L de mosto}}} = \frac{525.2148 \text{ mg de C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2}{\text{L de mosto}} \times 4 \text{ L de mosto}$$

$$= 2100.8592 \text{ mg} = 2.10 \text{ g de C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \text{ en } 4 \text{ L de mosto}$$

$$= 0.53 \text{ g de C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 / \text{L de mosto (cantidad máxima permisible)}$$

Donde:

N: nitrógeno

50 mgN/L: concentración final de nitrógeno deseada en los mostos

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: fórmula molecular de la L-arginina

14.007 mg N: masa de nitrógeno contenida en 1 mmol de L-arginina

4 mmol N: número de mmoles de nitrógeno en 1 mmol de L-arginina

174.2 mg/mmol: masa molar de la L-arginina

S.c: levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ex-bayanus)

## Apéndice 2. Determinación del grado alcohólico de los hidromieles

$$\% \text{ alcohol} = \frac{\rho_o - \rho_f}{0.776} \times 100 = \frac{1.12 - 1.01}{0.776} \times 100 = 14.18 \% \text{ v/v}$$

Donde:

$\rho_o$ : densidad inicial (medición realizada en el día 0)

$\rho_f$ : densidad final (medición realizada en el último día de fermentación primaria, correspondiente a cada hidromiel)

DERECHOS RESERVADOS

## Apéndice 3. Tamaño de la muestra de la población

$$n = \frac{N \times Zc^2 \times p \times q}{e^2 \times (N-1) + Zc^2 \times p \times q} = \frac{55\,377 \times 1.64^2 \times 0.50 \times 0.50}{0.15^2 \times (55\,377-1) + 1.64^2 \times 0.50 \times 0.50}$$

$$n = 29.87 \text{ personas} \cong 30 \text{ personas}$$

Donde:

n: tamaño de la muestra a evaluar

N: número de individuos de la población

Zc: intervalo de confianza requerido para el experimento

p: probabilidad de éxito

q: probabilidad de fracaso

e: error máximo admisible

DERECHOS RESERVADOS