



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción**

**Amaury José Blanco Paz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá, Colombia

2016



# **Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a diferentes escalas de producción**

**Amaury José Blanco Paz**

Tesis de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ingeniería Química**

Director (a):

Ph.D., M.Sc., Marta Cecilia Quicazán Sierra

Línea de Investigación:

Bioprocesos e Ingeniería de Alimentos

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2016



*Cada decisión que tomé, cada persona que me crucé, cada instante que viví, cada suceso dentro y fuera de mi alcance, todos y cada uno de esos momentos me condujeron hasta éste: la culminación de uno de mis más grandes logros.*



## **Agradecimientos**

Quiero agradecer especialmente a mis padres, por ser constantemente esa fuerza impulsora que me motiva a emprender los más duros caminos, a nadar en los mares más turbulentos y a levantarme después de caer; a mis hermanas, por el apoyo y las palabras oportunas y a toda mi familia por ser mi principal ejemplo de superación, tenacidad y constancia en todos los aspectos de la vida.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA, a la Facultad de Ingeniería y al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia. Al Departamento Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias por la financiación de los proyectos “Desarrollo de un modelo productivo de bebidas fermentadas de miel como estrategia para generar valor en el ámbito característico de la apicultura en Colombia” durante el periodo 2012-2014 y “Desarrollo de bebidas fermentadas de frutos rojos nativos de Colombia y evaluación de sus características bioactivas y sensoriales” en el año 2013 que hicieron posible mi formación profesional en el ámbito de la investigación y la contextualización para la formulación de este proyecto.

A la profesora Marta Quicazán a quien no sólo debo la dirección de este proyecto de investigación, sino una gran amistad que me ha hecho ser un mejor humano y profesional.

A los apicultores Francisco Silva, Ramón Galvis, Baudilio Suárez y sus familias por su hospitalidad, calidez, desinteresada colaboración en las distintas etapas de este proyecto y valioso aporte en mi formación profesional y personal.

A Martha Cuenca, Cristian Hernández, Angélica Benavides, Carlos Zuluaga, Carlos Fuenmayor, Andrés Durán, Andrés Martínez, Claudia Salazar, Claudia Hernández, Mario Rodríguez, Mario Dávila, William Mora, Giordan Vivas, Diego Martínez, Lizeth Castro, Ana Ruby Correa, Aura Flechas, Ana María Téllez y Daniela Flórez por los consejos, el ejemplo,

las charlas, la motivación, los cafés, los tés y tantos momentos que enriquecieron esta experiencia y la hicieron (más) placentera.

A toda la gran familia del ICTA por su constante apoyo, incuestionable amistad y disposición durante todos estos años.

## Resumen

El hidromiel es una bebida alcohólica tipo vino obtenida mediante fermentación de miel de abejas diluida, que representa una alternativa para el desarrollo tecnológico y económico de la cadena apícola en Colombia. Sin embargo, el escaso conocimiento cinético sobre la fermentación conlleva a procesos ineficientes y productos de baja calidad. En esta investigación se llevó a cabo el modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel a escalas de laboratorio y piloto utilizando *Saccharomyces cerevisiae* var. Bayanus y polen apícola como fuente de nitrógeno. Se implementó un diseño factorial completo para evaluar la influencia de la concentración inicial de glucosa, fructosa y nitrógeno asimilable por la levadura (NAL) sobre la producción de etanol y glicerol y el rendimiento etanol/azúcares. Mediante la Metodología de Superficie de Respuestas se obtuvieron valores óptimos de 22% p/p de azúcares y de 123 mg/L de NAL iniciales logrando disminuir el tiempo de fermentación de 8-10 días a 7-8 días. Se ajustaron expresiones matemáticas de los modelos de Gompertz y logístico de tres y cuatro parámetros con altos grados de correlación para los perfiles cinéticos de glucosa, fructosa, glicerol y etanol medidos mediante HPLC, NAL determinado por el método de Sorensen y crecimiento celular mediante recuento de UFC. El ensayo a escala piloto presentó diferencias en los perfiles cinéticos de azúcares y etanol, así como en el contenido de etanol (12.4% v/v) y glicerol (8.5 g/L), acidez volátil (0.27 g/L), rendimiento etanol/azúcares (0.413 g/g) y productividad (0.51 g/L-h), en comparación con el ensayo a escala de laboratorio (15.1±0.2% v/v de etanol, 6.6±0.6 g/L de glicerol, acidez volátil de 0.14±0.01 g/L, rendimiento de 0.507±0.005 y productividad de 0.73±0.01 g/h/L). También se encontraron diferencias significativas en las propiedades sensoriales, principalmente en cuerpo y equilibrio, complejidad de olores y aromas y color. La razón principal de estas diferencias fue las variaciones en la temperatura ambiental en las pruebas a escala piloto.

**Palabras clave:** Hidromiel, nitrógeno asimilable, *Saccharomyces cerevisiae*, modelo de Gompertz, modelo logístico

## Abstract

Mead is a wine-like alcoholic beverage obtained by fermentation of diluted bee honey, which consists in an alternative for technological and economic development of Colombian beekeeping chain. Nevertheless, the scarce knowledge about fermentation kinetics leads to inefficient processes and low quality products. In this work, the kinetic modelling of alcoholic fermentation of honey using *Saccharomyces cerevisiae* var. Bayanus and bee pollen as nitrogen source at lab and pilot scales was carried out. Full factorial design was implemented to assess the influence of initial glucose, fructose and yeast assimilable nitrogen (YAN) contents over ethanol and glycerol production and ethanol/sugars yield. By means of Response Surface Methodology optimal initial values of 22% w/w of sugars and 13 mg/L of YAN were obtained. Under these conditions, it was possible to reduce fermentation time from 8-10 days to 7-8 days. Mathematical expressions for Gompertz and logistic models were fitted for kinetic profiles of glucose, fructose, glycerol and ethanol measured by HPLC, YAN calculated by Sorensen method and cell growth by CFU counting, with high degree of correlation. Differences were found for kinetic profiles of sugars and ethanol, as well as for ethanol (12.4% v/v) and glycerol (8.5 g/L) contents, volatile acidity (0.27 g/L), ethanol/sugar yield (0.413 g/g) and productivity (0.51 g/L-h) in pilot scale in comparison with lab scale (15.1%±0.2% v/v of ethanol, 6.6±0.6 g/L of glycerol, volatile acidity of 0.14±0.01 g/L, 0.507±0.005 g/g, 0.73±0.01 g/L-h). Significant differences for sensory properties were also found, mainly for body and balance, odor and aroma complexity and color. The main reason for these differences was the variations in environmental temperature at pilot scale test.

**Keywords:** Mead, assimilable nitrogen, *Saccharomyces cerevisiae*, Gompertz model, logistic model

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>5</b>
1.1 Fermentación alcohólica .....	5
1.1.1 Microorganismos en la fermentación alcohólica .....	6
1.1.2 Cinética de crecimiento celular.....	9
1.1.3 Efecto de algunas variables sobre el metabolismo celular .....	11
1.2 Nitrógeno asimilable por la levadura .....	13
1.3 Cinética de la fermentación alcohólica .....	15
1.3.1 Modelo de Monod .....	18
1.3.2 Modelo de Gompertz.....	20
1.3.3 Modelo logístico .....	21
1.4 Fermentación alcohólica de miel.....	23
1.5 Producción de hidromiel .....	26
1.5.1 Acondicionamiento de la miel como sustrato fermentativo .....	27
1.5.2 Fermentación alcohólica del medio .....	30
1.5.3 Ajustes post fermentativos .....	30
1.5.4 Requisitos de calidad de los hidromieles.....	31
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>33</b>
2.1 Materias primas .....	34
2.1.1 Miel de abejas.....	34
2.1.2 Polen apícola .....	34
2.1.3 Microorganismo fermentativo .....	34
2.1.4 Agua de dilución.....	35
2.2 Métodos de caracterización y monitoreo.....	35
2.2.1 Caracterización de la miel de abejas.....	35
2.2.2 Caracterización del polen apícola.....	35
2.2.3 Monitoreo y caracterización de hidromieles.....	36
2.2.4 Análisis cromatográficos .....	36

---

2.2.5	Análisis microbiológicos.....	37
2.2.6	Recuento de células viables de levadura.....	37
2.2.7	Evaluación sensorial.....	38
2.3	Experimentación.....	42
2.3.1	Microfermentaciones en laboratorio (0,2 L).....	42
2.3.2	Fermentaciones en laboratorio (3 L).....	44
2.3.3	Fermentación en lotes a escala piloto (100 L).....	45
2.4	Análisis estadístico y modelamiento.....	47
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>48</b>
3.1	Caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de las materias primas.....	48
3.2	Microfermentaciones alcohólicas.....	53
3.3	Fermentaciones alcohólicas en bioreactor de 3 L.....	61
3.4	Fermentación a escala piloto.....	72
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>85</b>
4.1	Conclusiones.....	85
4.2	Recomendaciones.....	86
<b>A.</b>	<b>Anexo: Ficha técnica de la levadura Uvaferm BC.....</b>	<b>87</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Medición del contenido de nitrógeno asimilable.....</b>	<b>89</b>
<b>C.</b>	<b>Preparación de muestras para análisis mediante HPLC.....</b>	<b>93</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Formatos para evaluación sensorial de miel, polen e hidromiel.....</b>	<b>94</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo: Resultados detallados de la Fase II: Microfermentaciones.....</b>	<b>97</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo: Análisis estadístico de resultados de la Fase II.....</b>	<b>99</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo: Desarrollo de modelos de regresión y de la optimización.....</b>	<b>105</b>
<b>H.</b>	<b>Anexo: Datos y resultados de las Fases II y de experimentación.....</b>	<b>117</b>
<b>I.</b>	<b>Anexo: Análisis estadístico sobre los modelos cinéticos ajustados.....</b>	<b>121</b>
	<b>Bibliografía.....</b>	<b>125</b>

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1-1: Ruta metabólica para la producción de etanol a partir de glucosa.....	8
Figura 1-2: Fases de crecimiento celular de microorganismos .....	9
Figura 1-3: Condiciones de estrés sobre la levadura durante la fermentación alcohólica. .....	10
Figura 1-4: Perfil de consumo de sustrato en una fermentación alcohólica por lotes .....	18
Figura 1-5: Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular sin inhibición (línea continua) y con inhibición por sustrato (línea discontinua) en una fermentación por lotes .....	18
Figura 1-6: Comparación gráfica de los modelos logísticos de Gompertz y Logístico.....	22
Figura 2-1: Bioreactor de 3 L utilizado para el modelamiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas .....	45
Figura 2-2: Vista de la planta piloto para producción de hidromiel en el municipio de Rivera (Huila) .....	46
Figura 3-1: Evaluación del tono de la miel de abejas.....	51
Figura 3-2: Evaluación de la intensidad del color de la miel de abejas .....	51
Figura 3-3: Evaluación de la intensidad de olor y aroma de la miel de abejas .....	51
Figura 3-4: Evaluación de la intensidad de sabores básicos de la miel de abejas .....	51
Figura 3-5: Evaluación de la intensidad de olor del polen apícola .....	52
Figura 3-6. Evaluación de la intensidad de sabores básicos del polen apícola.....	52
Figura 3-7: Evaluación de defectos de olor y aroma del polen apícola .....	52

---

Figura 3-8: Efecto del contenido inicial de azúcares (glucosa y fructosa) en el mosto fermentativo sobre la producción de etanol y glicerol y consumo de azúcares y NAL .....	56
Figura 3-9: Efecto del contenido inicial de nitrógeno asimilable por la levadura en el mosto fermentativo sobre la producción de etanol y glicerol y consumo de NAL.....	57
Figura 3-10: Superficie de respuesta para la influencia del contenido de azúcares y NAL iniciales sobre el rendimiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas.....	58
Figura 3-11: Superficies de respuesta para la influencia del contenido de azúcares y NAL iniciales sobre el rendimiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas.....	58
Figura 3-12: Monitoreo de los grados Brix durante la fermentación alcohólica .....	62
Figura 3-13: Monitoreo del pH durante la fermentación alcohólica .....	62
Figura 3-14: Perfiles de consumo de sustratos (* azúcares totales, ■ glucosa, ● fructosa, ○ nitrógeno asimilable) y producción de alcoholes (▲ etanol, ◆ glicerol) en la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C .....	63
Figura 3-15: Crecimiento celular de <i>S. cerevisiae</i> durante la fermentación alcohólica ....	64
Figura 3-16: Modelo ajustado para los resultados experimentales del crecimiento celular (UFC/mL) en función del tiempo de fermentación. ....	68
Figura 3-17: Ajuste cinético de la velocidad específica de crecimiento celular en función del tiempo para la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	69
Figura 3-18: Cinéticas experimentales y modelos ajustados para el consumo de glucosa y fructosa durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio .....	70
Figura 3-19: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para el consumo de nitrógeno asimilable durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio .....	71
Figura 3-20: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de etanol durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio.....	71
Figura 3-21 Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de glicerol durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio.....	72
Figura 3-22: Comparación de los grados Brix durante la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala piloto y de laboratorio .....	73

---

Figura 3-23: Comparación del índice de pH durante la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala piloto y de laboratorio.....	73
Figura 3-24: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para el consumo de nitrógeno asimilable .....	74
Figura 3-25: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para el consumo de glucosa y fructosa .....	74
Figura 3-26: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para la producción de etanol.....	76
Figura 3-27: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para la producción de glicerol .....	77
Figura 3-28: Cinéticas experimentales y modelos ajustados para el consumo de glucosa y fructosa durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto.....	79
Figura 3-29: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de etanol durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto .....	79
Figura 3-30: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de glicerol durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto .....	80
Figura 3-31: Comparación del tono de los hidromieles .....	81
Figura 3-32: Comparación de la intensidad de color de los hidromieles .....	81
Figura 3-33: Comparación de atributos olfativos y gustativos de los hidromieles obtenidos a escala de laboratorio y piloto .....	81
Figura 3-34: Comparación de la complejidad de olores y aromas de los hidromieles obtenidos a distintas escalas de producción.....	83
Figura 3-35: Comparación del perfil de defectos de olor y aroma de los hidromieles obtenidos a distintas escalas de producción.....	83

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1-1: Requisitos de calidad fisicoquímica para vinos de frutas (ICONTEC, 2000)...	32
Tabla 2-1: Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de miel de abejas.....	39
Tabla 2-2. Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de polen apícola.....	39
Tabla 2-3: Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de hidromiel.....	40
Tabla 2-4: Descripción de los grados de calidad para la evaluación de algunas características sensoriales de los hidromieles.....	41
Tabla 2-5: Factores y niveles en el diseño factorial completo $3^2$ .....	43
Tabla 2-6: Matriz de diseño con los tratamientos e interacción entre factores.....	43
Tabla 3-1: Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la miel de abejas.....	48
Tabla 3-2: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del polen apícola.....	49
Tabla 3-3: Concentraciones finales de ART (glucosa y fructosa), NAL, etanol, glicerol y rendimiento de las fermentaciones alcohólicas.....	54
Tabla 3-4: Estimadores de los parámetros del modelo de regresión para el rendimiento	59
Tabla 3-5: Características fisicoquímicas del hidromiel elaborado y comparación con valores predichos y requisitos de calidad de la normatividad colombiana.....	65
Tabla 3-6: Caracterización fisicoquímica del hidromiel elaborado a escala piloto.....	77
Tabla 3-7 Comparación de los perfiles sensoriales descriptivos de los hidromieles elaborados a diferentes escalas de producción.....	84

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$A_1$	Coeficiente del modelo logístico	
$A_2$	Coeficiente del modelo logístico	
$K_I$	Constante de inhibición	$\text{g L}^{-1}$
$K_S$	Constante de saturación	$\text{g L}^{-1}$
$x_A$	Concentración de azúcares	% p/p
$x_N$	Concentración de nitrógeno asimilable	mg/L
$t$	Tiempo	h
$y$	Variable de respuesta	
$A$	Coeficiente del modelo logístico	
$ART$	Concentración de azúcares residuales totales	g/L
$ETA$	Contenido final de etanol	% v/v
$GLI$	Contenido final de glicerol	g/L
$NAL_f$	Concentración de nitrógeno asimilable residual	mg/L
$P$	Concentración de producto	
$S$	Concentración de azúcares (glucosa y fructosa)	$\text{g L}^{-1}$
$X$	Concentración celular	$\text{g L}^{-1}$
$Y$	Rendimiento	g/g
$a$	Coeficiente del modelo de Gompertz	
$c$	Coeficiente del modelo de Gompertz	
$d$	Coeficiente del modelo logístico	
$k$	Coeficiente del modelo de Gompertz	
$p$	Coeficiente del modelo logístico	
$q$	Velocidad volumétrica de consumo o producción	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$r$	Velocidad específica de consumo o producción	$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
$x$	Variable independiente	

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento	$\text{h}^{-1}$

## Subíndices

<b>Subíndice</b>	<b>Término</b>
0	Condición inicial
max	Máximo
$i$	Compuesto químico
$j$	Compuesto químico
$x$	Biomasa

## Superíndices

<b>Superíndice</b>	<b>Término</b>
n	Exponente

# Introducción

La producción de hidromiel, bebida tipo vino obtenida a partir de la fermentación alcohólica de miel, ha existido desde tiempos ancestrales, expandiéndose a países de América, Europa, África y Asia, en donde a pesar de ser un producto mayoritariamente artesanal es valorado por ciertos consumidores. En Estados Unidos y en algunos países europeos, donde existe un mercado considerable de hidromiel, éste es usualmente comercializado en licorerías, hidromielcerías (tiendas especializadas en la comercialización de hidromieles o fábricas de hidromiel), vinerías y cervecías; mientras que en países donde su consumo es menos popular, normalmente se consigue directamente en granjas y tiendas apícolas.

Esta bebida ha venido ganando importancia económica en países como Polonia o República Checa, donde hay una fuerte tradición de consumo, Estados Unidos, Uruguay y Brasil, donde viene dejando de ser un producto artesanal por uno industrializado con volúmenes de venta importantes. En Estados Unidos, por ejemplo, la industria del hidromiel contaba con 150 fábricas en 2014, con precios de venta entre los 11 y 20 dólares y hasta 70 dólares para productos *Premium*. Entre los años 2012 y 2013, mostró un incremento del 103% en la producción y de más del 130% en las ventas netas reportadas, lo que le ha valido el reconocimiento de la industria más pequeña de mayor crecimiento de todos los segmentos productores de bebidas alcohólicas (American Mead Maker Association, 2014).

Aunque a nivel mundial, el vino sigue siendo el más popular, la creciente demanda por productos que ofrezcan nuevos sabores y aromas, y los cambios en las preferencias de consumo, particularmente por vinos especiales y de primera calidad, y el auge de las cervezas artesanales han generado una atmósfera favorable para la incursión del hidromiel en el mercado de vinos. El hidromiel representa una bebida con un gran potencial comercial, cuya introducción al mercado permitirá generar un incremento de su valor económico actual mejorando consigo los ingresos de los productores.

Colombia no es un país con una cultura y tradición vinícola reconocida. Entre 2010 y 2013 el consumo de vino se incrementó en un 254%, con un consumo per cápita alrededor de 1,3 litros (Prochile, 2014), lo cual representa un bajo crecimiento en comparación con otras bebidas como la cerveza o las destiladas. Sin embargo, está comenzando a establecerse en el país una cultura del vino y una tendencia hacia un mayor consumo y apreciación del mismo, mostrando ser una oportunidad para incursionar en este mercado.

En Colombia, la industria alrededor del hidromiel o vino de miel es incipiente, con volúmenes de producción casi nulos, alrededor de la cual no existe una demanda que trascienda el mercado local, formado mayoritariamente por el círculo familiar y de amistades del productor. Sin embargo, se observa una incipiente popularización del hidromiel a nivel nacional a través de medios de divulgación escritos y eventos especializados, así como la creación de una cultura de consumo principalmente dentro del sector apícola.

En este aspecto, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA de la Universidad Nacional de Colombia mediante la ejecución del Proyecto “Desarrollo de un modelo productivo de bebidas fermentadas de miel como estrategia para generar valor en el ámbito característico de la apicultura en Colombia” financiado por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia en conjunto con la Asociación de Apicultores y Criadores de Abejas de Boyacá – ASOPIABOY y la Cooperativa Integral de Apicultores del Huila – COAPI, ha hecho una contribución importante con el fin de mejorar el proceso productivo de hidromiel con criterios de calidad, que concluyó en la instalación de las dos primeras plantas piloto para la elaboración de este producto. Ambas plantas se encuentran operando en la actualidad con la asesoría del Instituto, puesto que aún persisten limitaciones tecnológicas y de conocimiento que conllevan a procesos fermentativos muy extensos o truncados, producción de olores y aromas desagradables y problemas de calidad fisicoquímica y sensorial.

Desde los años 80, la investigación ha venido aportando conocimiento sobre la fermentación alcohólica de miel de abejas, incluyendo condiciones de operación recomendadas que permitan superar los principales inconvenientes presentados en este proceso. En este sentido, se han hecho contribuciones en torno a la cepa de levadura del

género *Saccharomyces* de cultivos comerciales y nativos de la miel de abejas, el tipo de miel de abejas, la configuración del reactor, la temperatura, la agitación, la dilución del medio, la composición y naturaleza de nutrientes, dentro de ellos el polen y el tamaño del inóculo. Sin embargo, destaca la poca información disponible sobre modelos cinéticos que describan la fermentación alcohólica de miel, que pueda transferirse a la industria con miras a monitorear y controlar este proceso de manera más efectiva.

En la industria del vino existen distintas áreas de enfoque en busca de incrementar la competitividad: monitoreo dinámico, simulación y predicción de la fermentación. Todas estas áreas, tienen como objetivo poder controlar la fermentación para corregir a tiempo desviaciones del comportamiento esperado que puedan alterar significativamente las características organolépticas del producto, para maximizar la eficiencia de operación de los equipos y para evitar pérdidas económicas por fermentaciones defectuosas. (O'Neill, van Heeswijck, & Muhlack, 2011). Para ello, se cuenta con una gran cantidad de técnicas analíticas tradicionales, como la medición de grados Brix, pH, densidad, etc. y otras más novedosas, como el uso de espectrómetros FT-IR, biosensores enzimáticos, lenguas electrónicas, etc., y adicional a éstas está la construcción de modelos matemáticos que no sólo son herramientas para entender los fenómenos biológicos, sino que permitan analizar datos experimentales, optimizar condiciones de operación y diseñar y escalar reactores a partir de datos obtenidos a pequeña escala (Assar, Vargas, & Sherman, 2012; Rinaldi et al., 2006; Wang & Liu, 2014). En la medida en que esto ocurra, será mucho más posible controlar y predecir el comportamiento de los procesos y con ello, mantener o a adquirir ventajas competitivas.

El presente proyecto tuvo como objetivo principal establecer expresiones matemáticas mediante el modelamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala de laboratorio y validar dichos modelos a escala piloto, a través del monitoreo de los principales indicadores de avance del proceso. Dentro de los resultados más importantes, se logró la optimización del contenido inicial de azúcares y de nitrógeno asimilable, cuyo impacto no sólo se vio reflejado en el mejoramiento cinético de la fermentación alcohólica sino en las características sensoriales del hidromiel, y se establecieron modelos matemáticos con alto grado de ajuste que mejorarán el control del proceso productivo de hidromiel a escala piloto en el municipio de Rivera (Huila).



# 1. Marco teórico

## 1.1 Fermentación alcohólica

La fermentación es el resultado de la respiración celular del microorganismo, para la obtención de energía mediante la producción de compuestos orgánicos oxidados. En este proceso, tanto el donador como el aceptor de electrones son compuestos orgánicos, por lo que no requieren oxígeno como aceptor final de los electrones. Por este motivo, los procesos fermentativos son considerados anaerobios (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). Desde un enfoque industrial la fermentación se define como el uso de un cultivo líquido sumergido de cepas de microorganismos seleccionadas o células de plantas o animales para la obtención de productos (McNeil & Harvey, 2008).

La fermentación alcohólica es uno de los procesos de fermentación más conocidos en la industria alimenticia, el cual ha sido empleado principalmente para la conservación de alimentos y para la generación de productos con características organolépticas específicas y de mayor valor agregado (Stanbury et al., 1995). La mayoría de procesos de fermentación alcohólica son realizados utilizando levaduras y algunas bacterias, en condiciones de anaerobiosis, que transforman los azúcares (compuestos orgánicos donadores iniciales de electrones), glucosa y fructosa, en etanol (aceptor final de electrones) y dióxido de carbono principalmente. Adicionalmente, se da la formación de moléculas de ATP, NADH/NAD<sup>+</sup> y NADPH/NAP<sup>+</sup> y de otros compuestos como ácidos orgánicos, ésteres (responsables de olores y aromas) y otros alcoholes (Assar et al., 2012; Villadsen et al., 2011).

### 1.1.1 Microorganismos en la fermentación alcohólica

En la industria de bebidas alcohólicas, particularmente cerveza y vino, la levadura de mayor utilización es la *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es un microorganismo anaerobio facultativo capaz de emplear un amplio rango de sustratos entre mono-, di-, y oligosacáridos, así como etanol, acetato, glicerol y lactatos, siendo la glucosa su fuente de carbono preferida (Dickinson & Schweizer, 2004). El tipo de levadura utilizada durante la fermentación alcohólica debe tener ciertas características como: ser altamente fermentativa, resistir la presencia de altos niveles de etanol, ser osmotolerante, presentar baja sensibilidad al ácido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) y no generar dificultades en la etapa de separación y purificación (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

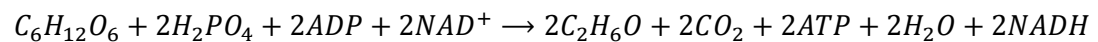
La *Saccharomyces cerevisiae* posee un metabolismo que le permite sobrevivir a altas concentraciones de azúcares. En condiciones de ausencia de carbohidratos puede emplear otras fuentes de carbono del medio como lactato, oleato o compuestos producidos por ella misma durante el proceso fermentativo como etanol, glicerol, piruvato o acetato, mediante lo que se conoce como crecimiento diaúxico. Por este motivo, la *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más ampliamente utilizado en los procesos de fermentación alcohólica (Atkinson, 1991).

Casi todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son glucofílicas. Esto significa que prefieren la glucosa como sustrato, la cual fermentan más rápidamente que la fructosa. La concentración de estos azúcares en el medio fermentativo condiciona la velocidad de reproducción y de crecimiento de este microorganismo. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras presentan un requerimiento energético en condiciones anaerobias de 0,036 gramo de célula por gramo de sustrato por hora, y de 0,022 gramo de célula por gramo de sustrato por hora en condiciones aeróbicas. En función de la cepa empleada, al final de la fermentación se pueden obtener contenidos de azúcares residual entre 10-56 g/L, en un tiempo de fermentación, que generalmente varía entre 119-170 horas (Sablayrolles, 2009).

La transformación de los azúcares fermentables, glucosa y fructosa, mediante fermentación alcohólica implica unos rendimientos teóricos de 51,1% para el etanol y 48,9% para el dióxido de carbono. Generalmente, el rendimiento en etanol se ve

disminuido en la realidad debido a la producción de otros productos de la fermentación como glicerol, acetaldehídos y ácidos orgánicos, y por la utilización de una fracción de los azúcares para el crecimiento y mantenimiento de la levadura.

La fermentación alcohólica inicia con el ingreso de la glucosa a las células del microorganismo, donde es degradada a dos moléculas de piruvato siguiendo la ruta de la glicólisis conocida como *Embden-Meyerhof-Parnass* (Figura 1-1). El piruvato es transformado en acetaldehído mediante descarboxilación, el cual es finalmente reducido hasta etanol. Adicionalmente, en esta ruta se generan distintos metabolitos secundarios como alcoholes superiores, ésteres, ácidos y diacetilos (Nelson & Cox, 2004; Villadsen et al., 2011). La fermentación alcohólica se describe globalmente mediante la siguiente reacción:



La cual puede simplificarse para obtener la siguiente expresión,

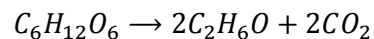
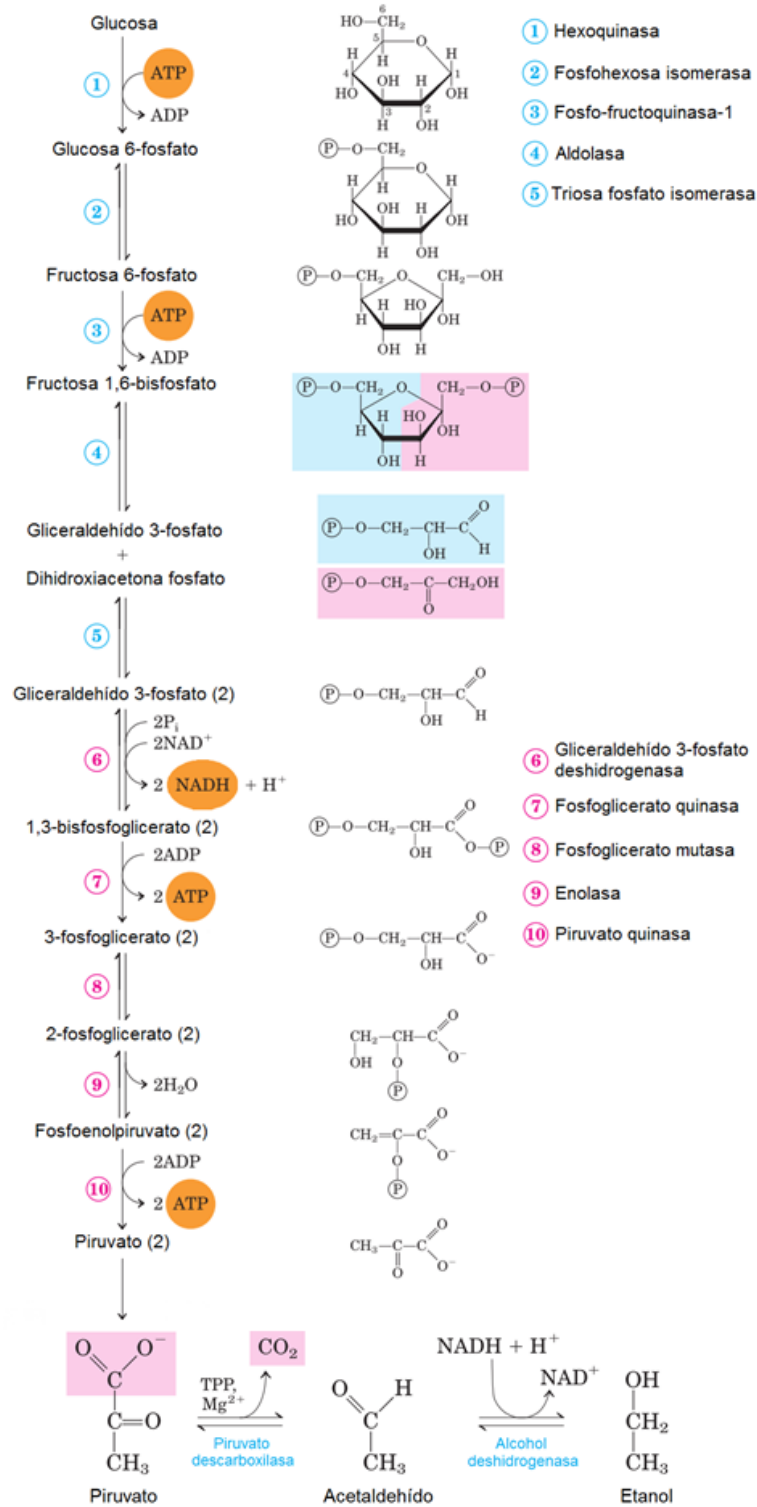


Figura 1-1: Ruta metabólica para la producción de etanol a partir de glucosa

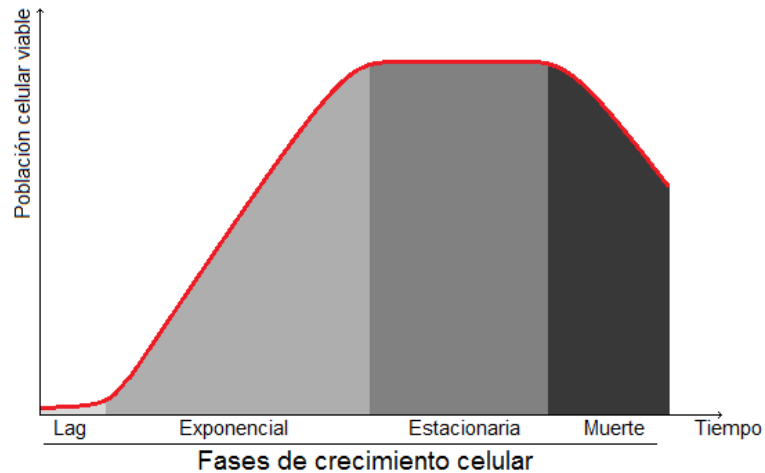


Adaptado de Nelson &amp; Cox (2004)

## 1.1.2 Cinética de crecimiento celular

El desarrollo de todo microorganismo está caracterizado por fases o etapas de adaptación, crecimiento, estabilidad y muerte, las cuales ocurren en función del tiempo (Figura 1-2).

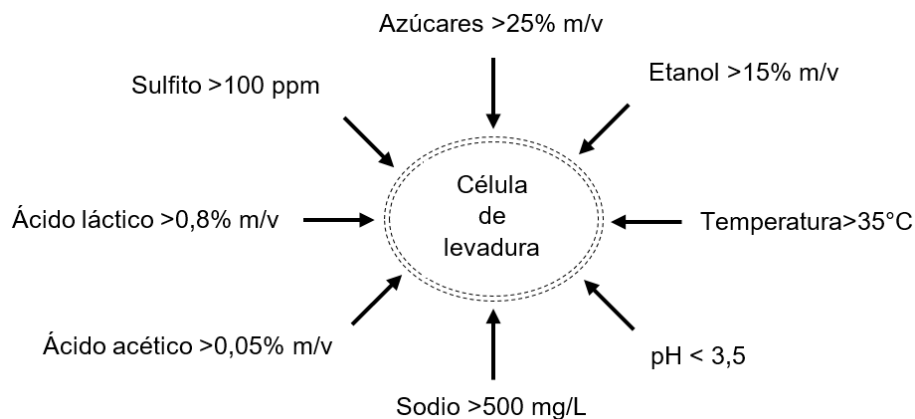
Figura 1-2: Fases de crecimiento celular de microorganismos



La fase de adaptación, fase de latencia o fase Lag, corresponde a la etapa durante la cual los microorganismos se adaptan a las condiciones del medio antes de reiniciar el ciclo celular. Normalmente esta etapa puede tardar entre 12–24 horas, periodo durante el cual las células se encuentran en un proceso de ajuste metabólico y reparación celular y por tanto no están en capacidad de reproducirse. Por este motivo, la población permanece constante. La duración de esta etapa puede variar dependiendo del estado de salud y metabólico de las células, del tamaño del inóculo y de la diferencia entre el medio del inóculo y el medio de fermentación. Durante la fase exponencial o fase Log, las células del microorganismo, ya adaptado a las condiciones del medio de fermentación, se duplican de manera continua y a ritmo constante, de modo que por cada período de tiempo la población crece exponencialmente a medida que se consumen los nutrientes del medio. Esta fase corresponde a la de mayor reproducción celular y su duración depende de la concentración inicial del sustrato limitante (en la mayoría de los casos, glucosa), de la temperatura y de características genéticas del organismo que determinan por ejemplo su habilidad para adaptarse a los nutrientes disponibles.

Una vez el sustrato empieza a escasear, el microorganismo empieza a disminuir su velocidad de crecimiento y se propaga menos en el medio, hasta alcanzar la fase estacionaria en la que el número de células del microorganismo no incrementa ni disminuye, pues la tasa de reproducción se equilibra con la tasa de muerte, por tanto la velocidad de crecimiento de la población es cero. Esta limitación en el crecimiento ocurre debido a dos situaciones: el agotamiento de nutrientes esenciales en el medio y la acumulación de sustancias de desecho, las cuales son tóxicas para las células en la mayoría de los casos. A pesar de esto, las células viables aún presentan actividad celular y metabólica. Finalmente, el ciclo de crecimiento entra en una fase de muerte o declive caracterizada por una mayor tasa de muerte debido al agotamiento de nutrientes y de reservas de energía, como consecuencia la población celular disminuye (Freshney, 2006; Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2010). Lo anterior ocurre debido a que durante el proceso fermentativo, las células de levadura están expuestas a diferentes condiciones de estrés que afectan su velocidad de reproducción. Algunas de estas condiciones son ambientales como deficiencia de nutrientes, alta temperatura y contaminación del medio, mientras que otras se relacionan con el funcionamiento del microorganismo como la producción de metabolitos de desecho tóxicos, como el etanol (Figura 1-3).

Figura 1-3: Condiciones de estrés sobre la levadura durante la fermentación alcohólica.



Adaptado de Bai, Anderson, & Moo-Young (2008)

### **1.1.3 Efecto de algunas variables sobre el metabolismo celular**

Algunas variables del proceso fermentativo como el pH, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes tienen una influencia significativa sobre el metabolismo y funcionamiento de las células de levadura, afectando su velocidad específica de crecimiento (Rinaldi et al., 2006). Se debe por tanto realizar un control sobre estos factores para garantizar el correcto desarrollo de toda fermentación alcohólica, así como unas características de calidad acordes a lo establecido por la normatividad correspondiente.

#### **Influencia del pH**

El funcionamiento de las levaduras a nivel celular se mantiene por la transferencia constante de protones de las células. El gradiente de concentración de iones hidrógeno entre el interior de las células y el medio, junto con el potencial eléctrico de la membrana de la célula, responsables de la fuerza motora de protones, se ve influenciado por las variaciones de pH del medio, las cuales afectan su composición y naturaleza debido a la disociación de ácidos y bases (Sablayrolles, 2009). La presencia de ácidos orgánicos incrementa el flujo de protones de los ácidos disociados, lo cual implica modificaciones del comportamiento general, como la disminución del rendimiento de glucosa por las altas concentraciones de ácidos (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2006).

A nivel cinético, el pH es un factor determinante en el crecimiento microbiano y en la producción de ciertos metabolitos. Por lo general, la mayoría de microorganismos presentan una velocidad de crecimiento alta y constante en un rango específico de pH. Por fuera de ese rango, el crecimiento decae rápidamente y las células empiezan a morir. Esta particularidad permite controlar la presencia de otros microorganismos en el medio fermentativo. Por ejemplo, las levaduras sobreviven en condiciones ligeramente ácidas a valores de pH entre 3,5 – 6,0, mientras que las bacterias lo hacen en un rango de pH de 6,5 – 7,5, aunque algunas ácido lácticas pueden sobrevivir hasta valores de pH cercanos a 2 (Assar et al., 2012; Jackson, 2008; Mato, Suárez-Luque, & Huidobro, 2005).

Finalmente, a nivel celular, el pH afecta los mecanismos de ingestión de sustratos, por ejemplo, ciertos valores de pH pueden facilitar el transporte de ciertas sustancias mediante difusión pasiva sin gasto de energía al alterar las cargas de las moléculas, modificar la

especificidad de las enzimas transportadoras específicas, limitando el transporte de ciertos compuestos al interior de las células o inactivar las enzimas externas por lo que el sustrato no se degradaría causando la muerte celular; la morfología (tamaño y forma de las células), la composición de las membranas y puede generar fenómenos de adhesión y floculación de las células.

### **Influencia de la temperatura**

La temperatura es uno de los parámetros de mayor importancia en el proceso de fermentación alcohólica. Las levaduras pueden sobrevivir en un rango de temperaturas entre 13 y 35°C. Dentro de este intervalo, cuanto mayor es la temperatura, la velocidad de la fermentación incrementa. Las temperaturas por debajo o por encima de este intervalo influyen negativamente sobre la reproducción de las levaduras ralentizando el proceso fermentativo y eventualmente, causando la muerte celular. La temperatura más adecuada se sitúa entre 20-25°C para en la elaboración de vinos blancos y entre 24-27°C para vinos tintos (Jackson, 2008).

### **Influencia de la disponibilidad de nutrientes**

Los principales nutrientes requeridos durante el crecimiento y metabolismo de las levaduras son los carbohidratos (glucosa y fructosa). Estos compuestos son la fuente de carbono y energía para el microorganismo y deben encontrarse en concentraciones superiores a 20 g/L. Sin embargo, la fermentación a muy altas concentraciones de carbohidratos genera un estrés osmótico que causa la plasmólisis de las células de levadura. Otros nutrientes como el nitrógeno asimilable por la levadura, generalmente en forma de amonio y aminoácidos, fosfatos, vitaminas, minerales, ácidos grasos de cadena larga y esteroides también son importantes para la levadura (O'Kennedy & Reid, 2008). El nitrógeno es el segundo elemento, después del carbono, más importante durante el crecimiento celular. Por lo tanto, la disponibilidad de compuestos nitrogenados incrementa la velocidad del proceso fermentativo, contribuye a la reducción en la producción de acidez volátil e influye positivamente sobre las características sensoriales del vino (Arias-Gil, Garde-Cerdán, & Ancín-Azpilicueta, 2007; Barbosa, Falco, Mendes-Faia, & Mendes-Ferreira, 2009; Bely, Rinaldi, & Dubourdieu, 2003; Garde-Cerdán et al., 2011) Para evitar inconvenientes, la concentración mínima de nitrógeno asimilable en el medio debe ser de 150 mg/L (O'Kennedy & Reid, 2008).

Las levaduras fermentativas presentan una gran variabilidad en términos de requerimientos y consumo de nitrógeno. Esto depende de las propiedades fisicoquímicas del medio, de la composición de compuestos nitrogenados, de las características genéticas de la cepa de levadura y de la temperatura de fermentación (Barbosa et al., 2009; Garder-Cerdán et al., 2011).

El oxígeno disuelto en los mostos para producción de vinos favorece la fermentación completa y le permite a las levaduras sintetizar ciertos compuestos esenciales como ácidos grasos insaturados, esteroides y ácido nicotínico. Sin embargo, una exposición excesiva al oxígeno es perjudicial, pues produce olores oxidados y oscurecimiento del color, principalmente en vinos blancos (Jackson, 2008).

## 1.2 Nitrógeno asimilable por la levadura

Durante el crecimiento las levaduras deben sintetizar todas las proteínas que requieren, para lo cual pueden utilizar los aminoácidos disponibles en el medio fermentativo o sintetizarlos a partir de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio.

El contenido total de nitrógeno de los mostos de uva incluye nitrógeno amoniacal (3-10%), aminoácidos (20-30%), péptidos, proteínas y ácidos nucleicos que proveen el nitrógeno necesario para el crecimiento de la levadura (Abernathy, 2009). Sin embargo, solo los iones amonio, los aminoácidos (excepto la prolina) y algunos péptidos de bajo peso molecular. El catión amonio ( $NH_4^+$ ) junto con las proteínas (2-5% del nitrógeno total), los polipéptidos (10-30% del nitrógeno total), compuestos por aminoácidos más o menos polimerizados y proteínas más o menos degradadas y la mayoría de aminoácidos libres (60-80% del nitrógeno total) como la arginina, la alanina, la serina, la treonina, la glutamina y el ácido glutámico constituyen la fracción de nitrógeno asimilable por las levaduras (Aerny, 1996).

El nitrógeno asimilable juega un papel importante tanto en la fase de crecimiento exponencial de la levadura, como en la estacionaria, en la que cantidades pequeñas de nitrógeno estimulan la fermentación alcohólica completa (Abernathy, 2009). Otras ventajas incluyen el incremento en la capacidad de reproducción, consumo de azúcares y

producción de etanol de la levadura (Mendes-Ferreira, Mendes-Faia, & Leão, 2004) y en general la mejora de las características cinéticas de la fermentación (Assar et al., 2012).

El uso de fuentes de nitrógeno asimilable tiene una gran importancia en la producción de vinos, pues acorta los tiempos de fermentación y reduce el riesgo de fermentaciones lentas o atascadas (Beltran, Esteve-Zarzoso, Rozes, Mas, & Guillamón, 2005) e influye sobre la producción de biomasa, glicerol, ácido acético y compuestos aromáticos volátiles. También está relacionado con la reducción en la producción de acidez volátil (Bely et al., 2003; Martínez-Moreno, Quirós, Morales, & Gonzalez, 2014) y en la producción de compuestos volátiles responsables de aromas y olores (Burin, Gomes, Caliar, Rosier, & Bordignon Luiz, 2015) Sin embargo, el nivel de impacto varía dependiendo del nivel de suplementación, el tipo de fuente de nitrógeno, la cepa de levadura empleada y las variaciones específicas en el medio fermentativo y en las condiciones de operación (Martínez-Moreno et al., 2014).

En bajas condiciones de nitrógeno asimilable, las levaduras no pueden reducir el azufre en aminoácidos azufrados, como metionina o cisteína, por lo que lo eliminan en forma de sulfuro de hidrógeno, el cual es responsable de olores y sabores de reducción como de huevos podridos. Esto además, favorece la producción alcohólicas superiores (Abernathy, 2009; IFV, 2016). Por el contrario, el exceso de nitrógeno asimilable en el medio fermentativo puede incrementar la síntesis de acetato de etilo generando olores a barniz (IFV, 2016), afectar gravemente la calidad sensorial y fisicoquímica del vino (Assar et al., 2012; Mendes-Ferreira et al., 2004) e impactar negativamente sobre la estabilidad y calidad del mismo (Mendes-Ferreira et al., 2004).

La concentración mínima requerida de nitrógeno asimilable durante la fermentación alcohólica de vinos es de 140 mg/L, de los cuales 50 mg/L deben estar en forma amoniacal. Sin embargo este requerimiento depende de factores como la cepa de levaduras, la concentración de azúcares y la temperatura de fermentación (IFV, 2016).

Las fuentes de nitrógeno asimilable utilizadas con mayor frecuencia en la elaboración de vinos son mezclas de sales de amonio como el fosfato de amonio (0,1 g/L) y el sulfato de amonio (0,2-0,5 g/L), vitaminas, extracto de levaduras, ácidos orgánicos, aminoácidos. La

reglamentación europea limita el empleo de sales de amonio (sulfato y fosfato) a una concentración total máxima de 1 g/L (IFV, 2016).

### **1.3 Cinética de la fermentación alcohólica**

Los modelos cinéticos consisten en expresiones matemáticas que relacionan el comportamiento de una o más variables de respuesta de interés a lo largo del tiempo a partir de datos experimentales. Estas relaciones vienen dadas por la estequiometría particular del proceso en estudio y por tanto, si ésta varía en función de las condiciones de operación, el modelo cinético no será válido. Un enfoque para el establecimiento de estos modelos cinéticos consiste en el análisis en estado estable del sistema, según el cual no existe acumulación de materias primas y por tanto todo el sustrato consumido es transformado en metabolitos y biomasa.

El empleo de estos modelos matemáticos para modelamiento cinético de la fermentación alcohólica es de utilidad para el diagnóstico de procesos lentos o atascados, así como para la evaluación y selección de mejores condiciones de operación y el estudio del impacto de la genómica de la levadura sobre este proceso (Assar et al., 2012)

Cuando se trata de procesos de fermentación alcohólica, algunas de las variables de mayor interés son las velocidades de producción de metabolitos (como alcohol, glicerol, ácidos orgánicos), de consumo de sustratos (como azúcares, nitrógeno, oxígeno) y de crecimiento del microorganismo en el bioreactor, así como el rendimiento y la productividad. En este caso, un modelo cinético puede ser, por ejemplo, la correlación de la velocidad de consumo de nitrógeno asimilable por la levadura a lo largo del tiempo de fermentación.

El establecimiento de modelos cinéticos para la fermentación alcohólica exige un absoluto control sobre las condiciones de operación en los experimentos realizados, principalmente a escala de laboratorio. Es de mucha importancia minimizar las variaciones en la temperatura, en las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales del medio fermentativo, los protocolos para la inoculación del bioreactor o en la naturaleza u origen de las materias primas. De lo contrario, estas perturbaciones pueden desencadenar una serie de cambios en la expresión de ciertos genes en las células del microorganismo,

pueden generar modificaciones graves en su metabolismo con efectos observables a nivel macroscópico (Villadsen et al., 2011). En procesos de fermentación alcohólica esto se ve reflejado en menores rendimientos y productividades, velocidades de consumo de sustrato más bajas, producción de metabolitos indeseados o modificación de las proporciones o concentraciones de los metabolitos de interés, por ejemplo.

Cuando se realizan análisis cinéticos de la fermentación alcohólica, se deben revisar dos conceptos de suma importancia: la productividad y el rendimiento. La primera se define como la velocidad de producción de un compuesto o de crecimiento celular por unidad de volumen del reactor (Ecuación 1.1; Villadsen et al., 2011).

$$q_{i,x} = \left[ \frac{\text{masa de compuesto o células}}{(\text{unidad de volumen})(\text{unidad de tiempo})} \right] \quad (\text{Ec. 1.1})$$

La productividad también puede expresarse por unidad de masa de células, definida como la velocidad específica de consumo o producción de un compuesto (Ecuación 1.2; Villadsen et al., 2011).

$$r_i = \frac{q_i}{X} = \left[ \frac{\text{masa de compuesto } i}{(\text{masa de células})(\text{unidad de tiempo})} \right] \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Donde,  $X$  es la concentración celular en el medio.

De igual manera se obtiene la productividad celular por unidad de masa de células ( $r_x$ ), que se define como la velocidad específica de crecimiento celular (Ecuación 1.3).

$$r_x = \frac{q_x}{X} = \left[ \frac{\text{masa de células}}{(\text{masa de células})(\text{unidad de tiempo})} \right] \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Las velocidades de consumo de sustratos se definen negativas y las de producción de metabolitos y crecimiento celular positivas.

El rendimiento de una fermentación alcohólica se define como la relación entre las velocidades volumétricas de consumo de sustrato o de producción de metabolitos (Ecuación 1.4; Villadsen et al., 2011).

$$Y_{ji} = Y_{i/j} = \left| \frac{q_i}{q_j} \right| = \left| \frac{r_i}{r_j} \right| \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Por ejemplo, el rendimiento etanol/glucosa se calcula como el cociente entre las velocidades de producción de etanol y de consumo de glucosa (Ecuación 1.5).

$$Y_{\frac{eta}{glu}} = \left| \frac{q_{eta}}{q_{glu}} \right| \left[ \frac{g_{eta}}{g_{glu}} \right] \quad (\text{Ec. 1.5})$$

En un reactor por lotes la velocidad volumétrica de consumo o producción de un compuesto se calcula mediante la estimación del cambio de la concentración del sustrato ( $S$ ) o del producto ( $P$ ) con respecto al tiempo (Ecuación 1.6; Villadsen et al., 2011).

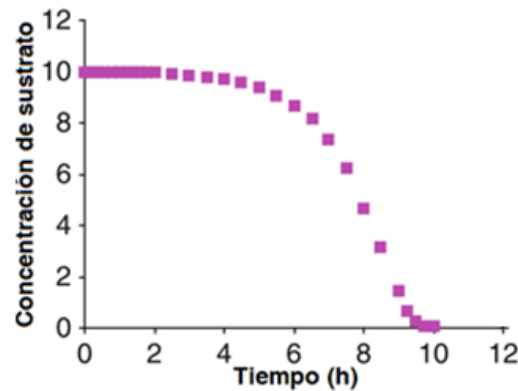
$$q_i = \frac{dS_i}{dt} \text{ o } \frac{dP_i}{dt} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

En procesos por lotes se observa que durante un proceso de fermentación alcohólica, la concentración de sustrato disminuye a lo largo del tiempo como consecuencia del crecimiento de los microorganismos. Luego de la fase de adaptación del microorganismo (Figura 1-4), el sustrato es consumido a una mayor velocidad. Esto depende de las condiciones de estrés en el medio (baja disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura, etc.) y del estado de salud de las células. Durante esta fase las células se dedican a realizar procesos de mantenimiento, de reparación celular, de síntesis de proteínas y de producción de energía para sobrevivir a estas condiciones. Estos procesos implican un consumo de sustrato sin crecimiento celular, cambios en la composición de la biomasa y un incremento de la velocidad específica de crecimiento al final de esta fase.

Posterior a la fase *lag*, la concentración celular empieza a incrementar con el tiempo durante la fase de crecimiento exponencial. Esta fase transcurre hasta que casi todo el sustrato se ha consumido; cuando esto ocurre el crecimiento se detiene rápidamente y, si

se mantiene esta condición dentro del reactor, las células del microorganismo perderán su viabilidad hasta que empiecen a morir y la concentración de biomasa a disminuir como se observa en la Figura 1-2.

Figura 1-4: Perfil de consumo de sustrato en una fermentación alcohólica por lotes

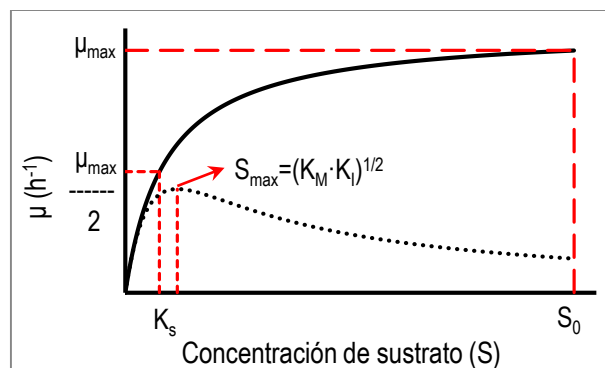


Fuente: Villadsen et al. (2011)

### 1.3.1 Modelo de Monod

Durante el proceso de fermentación alcohólica, el crecimiento celular muestra que a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad específica de crecimiento es proporcional a la concentración de sustrato ( $S$ ), pero a medida que ésta va aumentando, la velocidad de crecimiento se acerca a un límite máximo (Figura 1-5). Este comportamiento se ha descrito mediante distintos modelos cinéticos, uno de ellos el modelo propuesto por Jacques Monod en 1942 (Villadsen et al., 2011).

Figura 1-5: Cinética de Monod para la velocidad de crecimiento celular sin inhibición (línea continua) y con inhibición por sustrato (línea discontinua) en una fermentación por lotes



A pesar de que el modelo cinético de Monod es completamente empírico y surge de una interpretación no estructurada y no segregada de las células, logra explicar de manera adecuada la mayoría de los comportamientos de crecimiento celular de levaduras y bacterias. Este modelo representa la velocidad específica de crecimiento celular en función de la concentración de sustrato, en una expresión bastante sencilla (Villadsen et al., 2011) (Ecuación 1.7):

$$r_x = \mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (Ec. 1.7)$$

En la expresión anterior,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ),  $\mu_{max}$  es la velocidad específica de crecimiento máxima ( $h^{-1}$ ),  $S$  es la concentración de sustrato (g/L) y  $K_S$  es la constante de saturación (g/L).

En particular, el crecimiento de las células de levadura durante la fermentación alcohólica se describe generalmente mediante este modelo. Monod sugirió que la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) era directamente proporcional a la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) e inversamente proporcional a la concentración de saturación ( $K_S$ ), definida como la concentración a la cual la velocidad específica de crecimiento de la levadura corresponde a la mitad de su valor máximo. La constante de saturación es por tanto un indicador de la velocidad con que el sustrato es asimilado por el microorganismo, o lo que es lo mismo, su afinidad. Ambos parámetros dependen de la composición del medio, de condiciones externas como la temperatura y el pH, de condiciones de estrés y, por supuesto, del microorganismo. Por ejemplo, la constante de saturación de la *Saccharomyces cerevisiae* cuando el sustrato es glucosa está alrededor de 150 mg/L, mientras que para el *Lactococcus cremoris* y el mismo sustrato, es de 2 mg/L (Villadsen et al., 2011).

La Figura 1-5 muestra que la fermentación por lotes sin inhibición por sustrato ni por producto inicia con una concentración de sustrato ( $S_0$ ) mucho más alta que la constante de saturación, por lo que la velocidad específica de crecimiento es casi constante durante casi todo el tiempo de fermentación. A medida que la concentración de sustrato se acerca a la constante de saturación, la velocidad específica de crecimiento empieza a disminuir y el consumo de sustrato se asemeja a una cinética de primer orden. Por el contrario, se

observa que en la fermentación con inhibición por sustrato la velocidad específica de crecimiento alcanza valores muy inferiores que en el comportamiento sin inhibición.

En el modelo de Monod sin inhibición por sustrato mostrado en la Figura 1-5, la constante de saturación divide el comportamiento en dos regiones: una región de baja concentración de sustrato donde  $\mu$  es fuertemente dependiente de la concentración de sustrato (comportamiento casi lineal) y una región de alta concentración de sustrato en la que la velocidad específica de crecimiento es más o menos independiente de la concentración de sustrato. Esto significa que la velocidad global de reacción es de primer orden cuando la concentración de sustrato tiende a cero y que la velocidad se vuelve constante a mayores valores debido a que toda la maquinaria metabólica está totalmente ocupada convirtiendo el sustrato (Villadsen et al., 2011).

### 1.3.2 Modelo de Gompertz

La ecuación de Gompertz es una función empírica formulada originalmente para la evaluación de riesgos en la industria de seguros y finanzas a través del ajuste de la mortalidad en humanos. Si bien este no es un modelo de carácter explicativo en cuanto al crecimiento celular, ofrece una alternativa satisfactoria en la representación de cinéticas de tipo sigmoideal. Ha sido utilizada ampliamente para describir el crecimiento de microorganismos en condiciones limitadas de nutrientes, asumiendo que la probabilidad de muerte del microorganismo incrementa exponencialmente con el tiempo (O'Neill et al., 2011). En su forma integral, esta ecuación consiste en una función de doble exponencial con 3 parámetros de ajuste que describe una curva sigmoideal asimétrica (Ecuación 1.16).

$$y = a * e^{-e^{-k(t-c)}} \quad (Ec. 1.16)$$

En el modelo de Gompertz se tiene que  $a$  es el valor potencial máximo de la variable de respuesta ( $y$ ) cuando la variable independiente ( $t$ ) tiende a infinito,  $c$  es el punto de inflexión de la curva y  $k$  es un factor estrictamente relacionado con la pendiente de la curva.

La utilización de modelos basados en la función de Gompertz ha mostrado buenas propiedades de ajuste en el modelamiento de datos experimentales de procesos de fermentación alcohólica (DeNittis, Zanoni, Minati, Gorra, & Ambrosoli, 2011), para el ajuste

de las cinéticas de consumo de azúcares, de producción de etanol y de crecimiento celular (O'Neill et al., 2011; Olaoye & Kolawole, 2013) y de producción de dióxido de carbono (Rinaldi et al., 2006), demostrando su utilidad para predecir el comportamiento de la fermentación basado en modelos de regresión a partir de un bajo número de datos experimentales

### 1.3.3 Modelo logístico

La ecuación o ley logística es, junto con el modelo cinético de Monod, uno de los modelos no estructurados más comunes para la descripción macroscópica del crecimiento celular (Ramon-Portugal, Delia-Dupuy, Pingaud, & Riba, 1997), incluyendo las fases exponenciales y estacionarias (Altiok, 2004; Olaoye & Kolawole, 2013). La forma generalizada consiste originalmente en un modelo independiente del sustrato (Ecuación 1.17), que considera la inhibición del crecimiento presentada en procesos de fermentación por lotes (Shanmuga Prakash, 2010; Y. Wang & Liu, 2014).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad (Ec. 1.17)$$

En donde  $X$  es la concentración de la biomasa celular en el tiempo  $t$ ,  $\mu_{max}$  es la velocidad específica máxima de crecimiento y  $X_{max}$  es la concentración celular máxima.

Al igual que el modelo de Gompertz, el modelo logístico no es explicativo. A pesar de ello, también ha sido empleado en el modelamiento del crecimiento celular en producción de vinos (Malherbe, Fromion, Hilgert, & Sablayrolles, 2004), la producción de compuestos aromáticos de vinos (David, Dochain, Mouret, Vande Wouwer, & Sablayrolles, 2011) y de obtención de etanol a partir de distintas materias primas (Kostov et al., 2012; Manikandan & Viruthagiri, 2010; D. Wang, Xu, Hu, & Zhao, 2004) mediante fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Debido a las variaciones intrínsecas y requisitos de la levadura, no existe una estructura universal para el modelo logístico (Kostov et al., 2012) y en la mayoría de los casos tendría que derivarse una expresión específica para cada caso particular. Sin embargo, existen

expresiones generales del modelo logístico cuyo grado de ajuste está ligado al número de parámetros incluidos, entre ellos los modelos logísticos de regresión de 3 y 4 parámetros.

En el modelo logístico de tres parámetros (Ecuación 1.18),  $x$  es la variable independiente,  $y$  es la variable de respuesta,  $A$  es el máximo valor de la variable de respuesta ( $y$ ),  $d$  es el punto de inflexión de la curva (donde cambia de dirección) y  $p$  es un factor relacionado con la pendiente de la curva.

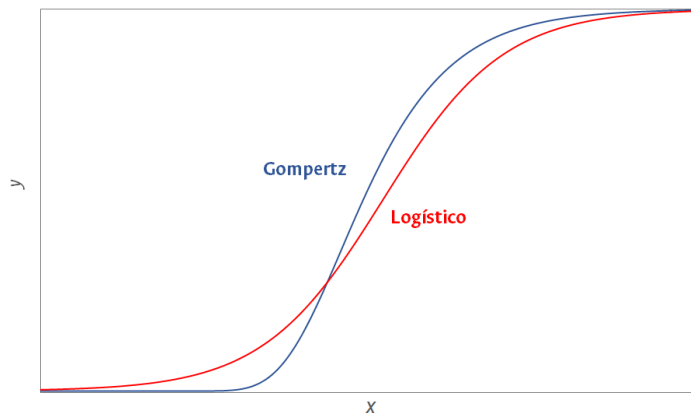
$$y = \frac{A}{1 + e^{-p(x-d)}} \quad (\text{Ec. 1.18})$$

En el modelo logístico de cuatro parámetros (Ecuación 1.19),  $x$  es la variable independiente,  $y$  es la variable de respuesta,  $A_1$  es el valor de  $y$  cuando  $x$  tiende a cero,  $A_2$  es el valor de  $y$  cuando  $x$  tiende a infinito,  $d$  es el punto de inflexión de la curva y  $p$  es un factor relacionado con la pendiente de la curva.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{d}\right)^p} + A_2 \quad (1.19)$$

En la Figura 1-6 se observan las curvas sigmoidales típicas para los modelos logísticos y de Gompertz, y se evidencian las diferencias entre ellos respecto a la simetría. El signo de los parámetros  $p$  (para el modelo logístico) y  $k$  (para el de Gompertz) determinan si la curva es creciente o decreciente.

Figura 1-6: Comparación gráfica de los modelos logísticos de Gompertz y Logístico



## 1.4 Fermentación alcohólica de miel

La miel de abejas es un producto de origen natural cuya composición y características sensoriales son muy variables. Éstas dependen principalmente de la fuente floral, así como de factores externos como condiciones climáticas y ambientales, y de los métodos de extracción y procesamiento. La miel contiene alrededor de 200 componentes diferentes incluyendo carbohidratos, minerales, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Ramalhosa, Gomes, Pereira, Dias, & Estevinho, 2011).

El principal componente de la miel de abejas son los carbohidratos, de entre los cuales el 80-90% corresponde a azúcares fermentables (glucosa y fructosa), 2-5% a disacáridos como sacarosa, maltosa, isomaltosa, turanosa y menos del 1% que equivale a oligosacáridos y dextrinas. El contenido de ácidos orgánicos varía entre 0,2-0,8% y el pH entre 3,4 y 6.1. Sin embargo, el pH no está relacionado directamente con la acidez debido al efecto amortiguador de los ácidos y minerales de la miel. El principal ácido orgánico de la miel es el ácido glucónico, seguido por los ácidos pirúvico, málico, cítrico, succínico y fumárico. La concentración de minerales de la miel de abejas es baja. Normalmente varía entre 0,04% para mieles claras y 0,2% para las oscuras. El mineral más abundante es el potasio seguido de calcio, cobre, hierro, manganeso y fósforo. La fracción de proteínas de la miel se encuentra alrededor de 0,2% y comprende enzimas como invertasa, diastasa, amilasa, glucosa oxidasa, catalasa,  $\alpha$ -glucosidasa y  $\beta$ -glucosidasa. De esta fracción, aproximadamente el 0,04% corresponde al nitrógeno total de la miel, que consiste principalmente de alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminos. La miel contiene gran cantidad de compuestos fenólicos como constituyentes secundarios, principalmente, flavonoides y ácidos fenólicos. La miel también contiene vitaminas C, B, complejo B2, ácido nicotínico y pantoténico en un contenido generalmente bajo. El ácido ascórbico es la única vitamina presente en cantidades apreciables con un contenido de 0.5% o más dependiendo del origen floral (Ramalhosa et al., 2011). Es claro que el contenido de azúcares fermentables, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, minerales y enzimas hacen de la miel de abejas un buen sustrato para la fermentación alcohólica.

A nivel microbiano la miel puede contener una variedad de microorganismos provenientes del polen, del tracto digestivo de las abejas, del polvo, del aire y/o de las flores. Los

microorganismos comúnmente encontrados son bacterias (*Bacillus*, *Micrococcus*), levaduras (*Saccharomyces* spp.) y esporas fúngicas (*Aspergillus*). Se han aislado algunas bacterias como *Escherichia coli* y especies de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Proteus* (Ramalhosa et al., 2011).

El hidromiel, aguamiel o vino de miel es una bebida con carácter tradicional obtenida a partir de la fermentación alcohólica mediante levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* de una mezcla de agua y miel de abejas, que puede llegar a contener entre 8 y 18% de etanol en volumen (Navrátil, Šturdík, & Gemeiner, 2001; Ramalhosa et al., 2011). La alta disponibilidad de la miel de abejas, junto con los bajos requisitos tecnológicos para su producción han posibilitado que el consumo de hidromiel se haya extendido durante más de 5.000 años, manteniéndose casi invariable el método de elaboración (Kime, Morse, & Steinkraus, 1998).

Históricamente, el hidromiel fue consumido en abundancia por los griegos, celtas, sajones y nórdicos en regiones no viticulturas (Bellik & Boukraa, 2013; Houston, 2006). Se cree que se originó en África mediante la fermentación realizada por levaduras naturales presentes en un panal abierto de miel que fue diluida por la lluvia. Sin embargo, los hidromieles más antiguos conocidos fueron elaborados en la Isla de Creta, cuando el vino y la cerveza no eran aún famosos, razón por la cual es considerado precursor de estas bebidas, e inclusive la primera bebida alcohólica elaborada por el hombre (Kime et al., 1998). Esta bebida era tradicionalmente ofrecida como regalo a los recién casados, para ser consumida durante el primer mes de matrimonio con el fin de asegurar la virilidad y la fertilidad, aspecto que dio origen al término “*luna de miel*” (Bellik & Boukraa, 2013; Kime et al., 1998; Miller, 1994).

Los griegos le dieron el nombre de “*melikraton*” y los romanos le llamaban “*aqua mulsum*” (Houston, 2006; Toussaint-Samat, 2009). En Polonia es denominada “*miód pitny*” que significa “miel bebible” (United States Agency for International Development, 2012), en Rusia se le llama “*medovukha*” (Revinskaya, 2013), en Finlandia es conocido como “*sima*”, donde es consumido exclusivamente durante la celebración del *May Day* (1° de mayo) (American Mead Makers Association, 2011; Diehl, n.d.; Miller, 1994). En Etiopía se prepara el “*tej*”, que equivale a un hidromiel saborizado con polvo de hojas secas, raíces y/o corteza de *gesho*, y en donde es considerada una bebida nacional (American Mead Makers

Association, 2011; Bahiru, Mehari, & Ashenafi, 2001; United States Agency for International Development, 2012). La Isla Santa de Lindisfarne en Gran Bretaña, es una de las regiones más famosas debido a la producción de hidromiel desde tiempos anglosajones, tradición mantenida hasta la actualidad. El hidromiel ha sido mencionado en el poema épico “*Beowulf*” y se cree que incluso el Rey Arturo lo consumió (Lindisfarne Ltd., 2011). En América, el “*balché*” fue una bebida producida por los mayas elaborada mediante fermentación de miel de abejas sin aguijón macerada con trozos de corteza del árbol al cual la bebida atribuye su nombre (American Mead Makers Association, 2011; Stross & Kerr, 1990). El *balché*, una de las bebidas rituales más importante para la sociedad maya, era utilizada como purgante y promotora de la salud, la fuerza y la longevidad (Vit, Pedro, & Roubik, 2013).

La fermentación alcohólica de miel es un proceso que generalmente requiere un tiempo extenso que puede variar entre varios meses hasta años. La velocidad de fermentación depende de varios factores como el tipo y la variedad de la miel, la temperatura, el pH, la composición del medio, la disponibilidad de nutrientes y la cepa de levadura. Estos factores también están relacionados con una serie de inconvenientes en la producción de miel como las fermentaciones lentas o atascadas, falta de uniformidad del producto y producción de olores y sabores indeseados (Ramalhosa et al., 2011).

Usualmente, las levaduras usadas en la producción de hidromiel a escala experimental son cultivos comerciales (*starter*) de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos cultivos han mostrado una adecuada adaptación al medio fermentativo de miel y altas eficiencias de conversión de los azúcares (Caridi, Fuda, Postorino, Russo, & Sidari, 1999). Existen pocos estudios sobre fermentación de miel usando otro tipo de microorganismos. Qureshi & Tamhane (1987) utilizaron la levadura *Hansenula anomala* en un proceso continuo de fermentación alcohólica de miel, la cual permitió obtener hidromieles con características de maduración rápida evitando de esta manera extensos periodos de añejamiento, que pueden demorar varios años y son muy costosos.

A nivel industrial, la producción de hidromiel se realiza en procesos por lotes en los cuales la fermentación es realizada por la diversidad de levaduras presentes en la miel. Sin embargo, esto supone una limitante para la estandarización del proceso en términos de calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial a lo largo del tiempo y entre lotes de

producción dada la diversidad de microorganismos nativos que intervienen en la fermentación espontánea de la miel.

Varios estudios han evaluado distintos aspectos de la producción de hidromiel utilizando cultivos *starter*, los cuales han permitido establecer el efecto de los parámetros de proceso de mayor importancia durante la fermentación alcohólica de miel. Entre estos aspectos se encuentran la formulación de nutrientes (Gomes et al., 2013; Mendes-Ferreira et al., 2010), la variedad de miel de abejas (Vidrih & Hribar, 2007), el uso de fuentes de nitrógeno convencionales y no convencionales (Pereira, Mendes-Ferreira, Oliveira, Estevinho, & Mendes-Faia, 2011; Roldán, Van Muiswinkel, Lasanta, Palacios, & Caro, 2011), el uso de células libres e inmovilizadas (Navrátil et al., 2001; A. P. Pereira, Mendes-Ferreira, Oliveira, Estevinho, & Mendes-Faia, 2014; Nasibuddin Qureshi & Tamhane, 1985, 1986), el tamaño del inóculo (A. P. Pereira, Mendes-Ferreira, Oliveira, Estevinho, & Mendes-Faia, 2013) y el uso de una cepa de levadura distinta de la *S. cerevisiae* (N. Qureshi & Tamhane, 1987). A pesar de todos los avances realizados en torno a la producción de hidromiel utilizando cultivos *starter*, aún persisten varios problemas en la fermentación alcohólica asociados al uso de cepas de levaduras que no son adecuadas para la composición específica del medio fermentativo de miel o a ciertas condiciones de estrés como la baja concentración de nutrientes esenciales y de minerales presentes en la miel (Iglesias et al., 2014).

## 1.5 Producción de hidromiel

En general, en los procesos de fermentación alcohólica se distinguen tres etapas: preparación del medio fermentativo, fermentación alcohólica del medio y ajustes post fermentativos. La primera etapa involucra el ajuste de las concentraciones de sustrato y de nutrientes importantes y la eliminación de microorganismos presentes en el medio. La segunda etapa incluye la preparación del inóculo de levadura y el inicio de la fermentación alcohólica., durante la cual se realizan actividades de monitoreo y control hasta lograr las concentraciones de etanol y de azúcares residuales deseadas. Finalmente, en la etapa de ajustes post fermentativos se realiza la finalización de la fermentación alcohólica y la purificación del producto final.

### **1.5.1 Acondicionamiento de la miel como sustrato fermentativo**

La miel contiene una gran variedad de nutrientes importantes para los microorganismos fermentativos. Sin embargo, estos nutrientes se encuentran en exceso o defecto, por lo que es necesario ajustarlos a niveles aptos para el crecimiento y metabolismo de las levaduras, mediante la adición de agua y suplementos nutritivos. Cuando no se realizan ajustes adecuados sobre el mosto, se incrementa la posibilidad de fermentaciones lentas o incompletas. Además, se pueden presentar refermentaciones de la levadura o fermentaciones secundarias por bacterias lácticas y acéticas, incrementando la acidez volátil y la producción de ésteres volátiles, que alteran la calidad organoléptica del hidromiel (Ramalhosa et al., 2011).

En esta etapa se distinguen cuatro actividades para el acondicionamiento de la miel como medio fermentativo:

#### **Dilución de la miel de abejas**

La miel de abejas, como sustrato de fermentación, pese a ser un medio de alto estrés osmótico para las levaduras por el elevado contenido de carbohidratos, se convierte en un medio de fermentación mediante la modificación de su contenido de humedad. Dependiendo del tipo de hidromiel deseado, la miel puede ser diluida en agua o en jugo de frutas hasta lograr el nivel de azúcares adecuado para el crecimiento y metabolismo de la levadura. Una dilución miel – agua de 1:3, aproximadamente 24°Brix, ha mostrado ser adecuada para el proceso de fermentación alcohólica (Sroka & Tuszyński, 2007).

#### **Suplementación del medio**

A pesar de que la miel contiene una gran cantidad de nutrientes, la concentración de éstos después de la dilución no satisface los requerimientos nutricionales de la levadura. En este sentido, existen en el mercado suplementos nutricionales que proporcionan nitrógeno, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales y sales esenciales para la levadura. Diversos estudios han utilizado suplementos comerciales (Navrátil et al., 2001), sales de amonio (Pereira et al., 2014), extracto de levadura (Blanco, Quicazán, & Cuenca, 2012) y polen (Roldán et al., 2011) como fuente de nitrógeno y de nutrientes en la fermentación alcohólica de miel, evidenciando la deficiencia de los mostos de miel en este aspecto.

En cuanto a la suplementación de nitrógeno, tanto la fuente como el contenido en el medio son importantes para la cinética de consumo de sustrato en la fermentación alcohólica, puesto que ambas influyen en el crecimiento de la *S. cerevisiae* (Mendes-Ferreira et al., 2004; Torija et al., 2003). Sin embargo, Navrátil et al. (2001) demostraron que no sólo el nitrógeno es importante para el avance de la fermentación de miel. En ese estudio evaluaron varias fuentes de nitrógeno, dos suplementos comerciales y fosfato de amonio, y encontraron que ambos suplementos comerciales ejercieron mayor influencia sobre el avance fermentativo, para los cuales se alcanzaron niveles de alcohol de 15% v/v, mientras que para fosfato de amonio fue alrededor de 6% v/v.

El polen es otra fuente natural de nutrientes que ha sido empleada en la fermentación alcohólica de miel. Esto se debe a su aporte de proteínas (aproximadamente 20%), lípidos, minerales, vitaminas y aminoácidos. Estudios han demostrado que la adición de polen apícola en concentraciones entre 15-30 g/L favorece la rápida adaptación de la levadura al mosto de miel, permite alcanzar concentraciones celulares más altas, incrementa la velocidad de fermentación y mejora el rendimiento alcohólico, así como la calidad sensorial de los hidromieles obtenidos (Kempka et al., 2015; Roldán et al., 2011).

### **Ajuste del pH**

El pH es un parámetro importante en el funcionamiento celular. Para las levaduras, un pH adecuado de trabajo se encuentra en un rango de 4,0-6,0. Por su parte, la miel de abejas tiene un pH que se encuentra entre 3,7-4,3 y los medios para fermentación alcohólica entre 3,5-4,0. En este aspecto, es posible obtener un medio fermentativo de miel de abejas sin necesidad de ajustar el pH en un valor específico. Durante el proceso fermentativo, el pH del medio disminuye drásticamente debido a la producción de los ácidos acético y succínico en los primeros días de la fermentación alcohólica y a la baja capacidad tampón de la miel, lo cual limita el correcto funcionamiento de la levadura (Ramalhosa et al., 2011; Sroka & Tuszyński, 2007). Por este motivo, una práctica común es la adición de un *buffer* como carbonato de calcio o de potasio, bicarbonato de potasio y ácido tartárico, para mantener el pH entre 3.7-4.0 durante toda la fermentación (Ramalhosa et al., 2011).

## Higienización del medio fermentativo

Aunque la miel posee una buena actividad antimicrobiana (Olaitan, Adeleke, & Ola, 2007), la dilución y la adición de nutrientes durante la preparación del mosto lo convierten en un sustrato apto para el crecimiento de microorganismos indeseados que pueden competir con las levaduras fermentativas. Por tanto se debe garantizar que la población de estos microorganismos sea lo más reducida posible antes de inocular el mosto. Esta reducción se puede lograr mediante tratamientos térmicos como la ebullición y la pasteurización, o químicos como la adición de ácido sórbico o de bisulfito de sodio (Jackson, 2008)

Los tratamientos térmicos son los métodos comúnmente utilizados, entre ellos la pasteurización. Esta técnica consiste en el calentamiento a bajas temperaturas (60-65°C) del mosto de miel durante 10-15 minutos, seguido de un enfriamiento rápido, causando la inactivación de la mayoría de microorganismos (Kime et al., 1998). La pasteurización también se emplea como tratamiento de estabilización microbiológica del hidromiel, además ofrece la ventaja de promover la desnaturalización y precipitación coloidal de las proteínas favoreciendo la clarificación (Jackson, 2008). Por otro lado, produce pérdida de aromas y genera notas de cocción, perjudicando la calidad sensorial deseada del producto final; y disminuye la calidad nutricional y funcional, degradando vitaminas, compuestos fenólicos, pigmentos y otros compuestos lábiles (Jackson, 2008; Ramalhosa et al., 2011). Este proceso, también contribuye a la formación de hidroximetilfurfural, el cual puede causar la inhibición de la fermentación alcohólica (Reed & Nagodawithana, 1990) o generar compuestos furfúricos que pueden perjudicar el aroma del hidromiel.

En cuanto a los tratamientos con agentes químicos, el ácido sórbico no presenta acción bactericida pero si fungicida, y se emplea para impedir la formación de impurezas denominadas "*flores del vino*". Sin embargo, en presencia de bacterias lácticas puede generarse degradaciones que no solo incrementan la acidez volátil sino que modifican el aroma característico del hidromiel. El metabisulfito, en forma de sales de sodio o potasio, libera dióxido de sulfuro, el cual inactiva la mayoría de los microorganismos. Su uso se encuentra bajo legislación y ha sido considerado como tóxico, por lo que la dosis aceptada en la elaboración de vinos se encuentra entre 60 a 80 mg/L.

### 1.5.2 Fermentación alcohólica del medio

La fermentación alcohólica es una etapa clave en el proceso productivo de hidromiel. Es en esta etapa en donde ocurre la transformación de una mezcla altamente azucarada en una más compleja y equilibrada con olores y sabores más desarrollados. Además de las características del medio y de la cepa de levadura utilizada, la temperatura es un factor que influye sobre la velocidad y productividad de la fermentación.

La mayoría de procesos de fermentación alcohólica se realizan a temperaturas entre 25°C y 30° C. Navrátil et al. (2001) evaluaron distintas temperaturas entre 25°C y 40°C en la fermentación alcohólica de miel, con la mayor concentración de etanol obtenida a 25°C. Sin embargo, en la fermentación de vinos blancos se emplean temperaturas ligeramente bajas, entre 18 y 22°C, para preservar mayores olores y aromas. A estas condiciones, la fermentación es más lenta alcanzando concentraciones de etanol de 16% tras 240 horas de proceso, mientras que a 25°C, es posible lograr concentraciones de 12% en 168 horas. En condiciones no controladas, la temperatura del medio puede incrementarse a valores cercanos a los 35°C debido a la fase de fermentación tumultuosa. Esta situación podría inhibir el crecimiento de los microorganismos limitando el rendimiento en la producción de etanol, por tanto es importante controlar la temperatura en valores cercanos a 25°C.

Durante esta etapa, se deben monitorear variables como el consumo de azúcares y la producción de alcohol y ácido acético principalmente, puesto que estas están relacionadas con la calidad del hidromiel.

### 1.5.3 Ajustes post fermentativos

Una vez que la fermentación ha finalizado, el hidromiel debe ser estabilizado. Para ello, se realiza un primer trasiego para retirar los sedimentos, principalmente células de levadura y polen apícola. Posteriormente, para evitar refermentaciones ocasionadas por células de levaduras suspendidas en el hidromiel, éste debe ser estabilizado. En esta etapa, el hidromiel puede ser modificado para proporcionarle distintas características sensoriales mediante la adición de miel de abejas, etanol potable, ácidos orgánicos permitidos como el tartárico o el cítrico y agentes clarificantes como gelatina o bentonita utilizados en la clarificación de vinos blancos (Jackson, 2008). La estabilización del hidromiel se realiza

mediante una pasteurización leve a 60°C durante 5 minutos, seguido de un enfriamiento, dando paso a la maduración del hidromiel. Esta fase puede demorar entre 3 y 6 meses, tiempo durante el cual ocurre la clarificación del hidromiel y éste adquiere sus características sensoriales definitivas. La maduración del hidromiel finaliza con el envasado

#### 1.5.4 Requisitos de calidad de los hidromieles

Tanto a nivel nacional e internacional, la normatividad respecto a los requisitos de calidad para el hidromiel es escasa, por lo tanto, lo más conveniente es evaluar la calidad de este producto con base en lo establecido en la industria de vinos.

En Polonia existe una serie de publicaciones que contienen protocolos de producción y algunos requisitos fisicoquímicos de calidad específicos para el hidromiel. Estas publicaciones clasifican el hidromiel según la proporción de miel y agua en: *półtorak*, *dwójniak*, *trójniak* y *czwórniak*. Los requisitos de calidad para el hidromiel más similar al que se propone desarrollar, denominado *czwórniak* (una parte de miel de abejas natural y tres partes de agua), son (Comisión Europea, 2007):

- Contenido de alcohol: 9-12% v/v
- Azúcares reductores después de inversión: 35-90 g/L
- Acidez total expresada como ácido málico: 3,5-8 g/L
- Acidez volátil expresada como ácido acético: máx. 1,4 g/L
- Extracto insoluble: mín. 15 g/L (20 g/L en el caso de hidromieles con frutas)
- Cenizas: mín. 1,3 g/L (en el caso de hidromieles con frutas)

En Colombia, la norma NTC 708 establece los requisitos fisicoquímicos de calidad que deben cumplir los vinos elaborados a partir de frutas distintas de la uva (Tabla 1-1), los cuales se han tomado como parámetros para la evaluación de calidad de los hidromieles.

Tabla 1-1: Requisitos de calidad fisicoquímica para vinos de frutas (ICONTEC, 2000)

<b>Parámetro de calidad</b>	<b>Límites</b>
Alcohol (%v/v a 20°C)	>6
Azúcares totales expresados como glucosa (g/L)	Seco: 0 – 15 Semiseco: 15,1 – 50 Dulce: >50
Acidez total expresada como ácido tartárico (g/L)	3,5 - 10
Acidez volátil expresada como ácido acético (g/L)	<1,2
Metanol (mg/L)	<1000
pH	2,8 – 4,0
Extracto seco reducido (g/L)	>10
Ácido sórbico o sus sales de sodio o potasio (mg/L)	<250
Colorantes artificiales	No permitido

## 2. Materiales y métodos

El desarrollo experimental de esta investigación se llevó a cabo en la Planta de Investigación en Procesos Vegetales, el Laboratorio de Propiedades Físicoquímicas de Alimentos y el Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA de la Universidad Nacional de Colombia.

Este trabajo se desarrolló en cuatro fases: la caracterización físicoquímica, microbiológica y sensorial de la miel de abejas y del polen apícola empleados; el desarrollo de ensayos de microfermentaciones alcohólicas de miel de abejas de 0.2 L; el desarrollo, monitoreo y modelamiento de fermentaciones alcohólicas de miel de abejas en un fermentador de 3 L y el desarrollo y monitoreo de la fermentación alcohólica de miel de abejas en un fermentador de 100 L y evaluación del modelo obtenido.

La primera fase se realizó mediante metodologías de análisis físicoquímico y microbiológico validadas en el ICTA para la miel de abejas y el polen apícola. El análisis sensorial se enfocó en la evaluación descriptiva de características visuales, olfativas, gustativas y táctiles y de los principales defectos de calidad encontrados en la miel de abejas y en el polen apícola.

En la segunda fase se optimizó el contenido inicial de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable por la levadura con respecto a la productividad etanólica de las fermentaciones alcohólicas de miel de abejas por lotes evaluadas mediante un diseño factorial completo  $3^2$ . Estos resultados se utilizaron en los ensayos de fermentación alcohólica por lotes en un fermentador de 3 L a partir de los cuales se modeló el consumo de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable por la levadura y la producción de biomasa y de etanol.

En la última etapa se buscó verificar el grado de ajuste de los modelos encontrados a partir de los resultados del monitoreo de una fermentación alcohólica de miel de abejas por lotes en un fermentador de 100 L. Esta etapa se llevó a cabo en una planta piloto para la producción de hidromiel ubicada en el municipio de Rivera en Huila bajo la administración de la Cooperativa Integral de Apicultores del Huila – COAPI.

## **2.1 Materias primas**

### **2.1.1 Miel de abejas**

Se utilizó miel multifloral de abejas *Apis mellifera* proveniente del municipio de Rivera en el departamento de Huila. La miel de abejas fue almacenada en refrigeración a 4°C hasta su utilización por un período no superior a seis meses.

### **2.1.2 Polen apícola**

Se utilizó polen apícola seco proveniente del municipio de Viracachá en el departamento de Boyacá, el cual fue sometido a procesos de limpieza en un separador tipo ciclón y por inspección visual. El polen apícola limpio fue almacenado en refrigeración a 4°C por un período no superior a 6 meses.

### **2.1.3 Microorganismo fermentativo**

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* subsp. bayanus marca Uvaferm BC® seleccionada del Instituto Pasteur (París, Francia) y distribuida por la empresa LALLEMAND Inc. Esta cepa se caracteriza por ser fructofílica y por tener una alta tolerancia a azúcares y etanol, una buena capacidad de predominio sobre microorganismos indígenas, un bajo requerimiento de nitrógeno y una baja producción de dióxido de azufre y de ácido acético. El microorganismo se mantuvo en su empaque original sellado y almacenado en refrigeración hasta su utilización. La ficha técnica de esta levadura se encuentra en el Anexo A.

### **2.1.4 Agua de dilución**

Se utilizó agua potable en presentación comercial marca Cristal, la cual se adquirió el mismo día de la preparación de los ensayos de fermentación alcohólica.

## **2.2 Métodos de caracterización y monitoreo**

A continuación se describen las metodologías de análisis empleadas en todas las etapas de experimentación para la caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de la miel de abejas y del polen apícola, así como para el monitoreo de los procesos de fermentación alcohólica y determinación de los atributos de calidad fisicoquímica y sensorial de los hidromieles finales.

### **2.2.1 Caracterización de la miel de abejas**

El contenido de sólidos solubles totales, expresado como grados Brix, se llevó a cabo utilizando un refractómetro portátil (58-90°Brix). El contenido de humedad, expresado como g/100g, se determinó de acuerdo con el método oficial AOAC 969.38B (AOAC, 2012) para la miel de abejas utilizando un refractómetro ABBE (Euromex, Holanda) y la curva estándar de Chataway para la correlación entre el contenido de humedad y el índice de refracción (Bogdanov, 2009). La acidez libre, expresada como mili-equivalentes por kilogramo, se determinó mediante titulación potenciométrica ácido-base según el método oficial AOAC 962.19 (AOAC, 2012). El pH se determinó justo antes de realizar la determinación de la acidez utilizando un medidor de pH (SCHOTT handylab pH 11 con electrodo SCHOTT BlueLine 14 pH, Alemania). El contenido de cenizas, expresado como g/100g, se determinó según el método oficial AOAC 920.181 y AOAC 968.08 (AOAC, 2012).

### **2.2.2 Caracterización del polen apícola**

El contenido de humedad, expresado como g/100g, se determinó por gravimetría según el método reportado por Fuenmayor et al., (2014). La acidez libre, expresada como mili-equivalentes por kilogramo, se realizó siguiendo la metodología reportada por Fuenmayor et al., (2014). El pH se determinó justo antes de realizar la determinación de la acidez utilizando un medidor de pH (SCHOTT handylab pH 11 con electrodo SCHOTT BlueLine

14 pH, Alemania). El contenido de proteína total, expresado como g/100g, se determinó a partir de la medición del nitrógeno mediante el método Kjeldahl con la variación de Winkler según el método oficial AOAC 984.13 (AOAC, 2012) utilizando un factor de conversión de N x 6,25. El contenido de nitrógeno asimilable se determinó mediante el método de Sorensen descrito por Baroñ (2011) con modificaciones. La descripción de esta metodología y la validación de la misma se presentan en el Anexo B. El contenido lipídico, expresado como g/100g, se determinó según el método oficial AOAC 920.39 (AOAC, 2012). El contenido de cenizas, expresado como g/100g, se determinó según el método oficial AOAC 968.08 (AOAC, 2012).

### **2.2.3 Monitoreo y caracterización de hidromieles**

La determinación del contenido de sólidos solubles totales, expresado como grados Brix, se realizó por refractometría según el método OIV-MA-AS2-02 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2015). La acidez titulable, expresada como gramos de ácido tartárico por litro, se determinó mediante titulación ácido-base según el método OIV-MA-AS313-01 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2015). El monitoreo del pH durante los ensayos de fermentación alcohólica a escala de laboratorio se realizó mediante el medidor de pH (Cole Parmer, USA) incluido en el bioreactor. A escala piloto el monitoreo de pH se realizó por potenciometría según el método OIV-MA-AS313-15 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2015). El contenido de nitrógeno asimilable durante el monitoreo de la fermentación alcohólica se determinó mediante el método de Sorensen descrito por Baroñ (2011) con modificaciones. La descripción de esta metodología y la validación de la misma se presentan en el Anexo B. La acidez volátil, expresada como gramos de ácido acético por litro, se determinó de acuerdo al método OIV-MA-AS313-02 (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2015).

### **2.2.4 Análisis cromatográficos**

La determinación de glucosa, fructosa, glicerol y etanol en muestras de miel de abejas, polen apícola e hidromieles y durante el monitoreo de los ensayos de fermentación alcohólica se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando un sistema (Jasco Inc., Japón) equipado con bomba PU-2031, horno CO-2065, detector de índice de refracción RI-2031 PLUS y una columna Sugar-Pak I 10  $\mu$ m, 6,5 mm x 300 mm (Waters

Inc., USA). Estas metodologías fueron adaptadas de los métodos oficiales AOAC 977.20 (AOAC, 2012) y AOAC 979.23 (AOAC, 2012) con modificaciones. El análisis se realizó a 80°C utilizando agua ultra-pura, desionizada, desgasificada y micro-filtrada (agua grado HPLC) como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min y con un volumen de inyección de 10 µL. La temperatura en el detector fue de 40°C. La preparación de las muestras de miel de abejas, de polen apícola y de hidromiel para el análisis se presenta en el Anexo C.

Se realizaron curvas de calibración para glucosa, fructosa, etanol y glicerol utilizando patrones de alta encontrando las siguientes expresiones (Ecuaciones 2.1-2.4):

$$\text{Glucosa} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 9,2073 * 10^{-5} * \text{Área} + 4,9695 * 10^{-1} \quad (R^2 = 0,9997) \quad (\text{Ec. 2.1})$$

$$\text{Fructosa} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 8,6480 * 10^{-5} * \text{Área} + 3,8223 * 10^{-1} \quad (R^2 = 0,9997) \quad (\text{Ec. 2.2})$$

$$\text{Glicerol} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 9,3528 * 10^{-5} * \text{Área} - 6,9430 * 10^{-2} \quad (R^2 = 0,9996) \quad (\text{Ec. 2.3})$$

$$\text{Etanol} \left( \% \frac{\text{v}}{\text{v}} \right) = 2,5770 * 10^{-5} * \text{Área} - 2,3144 * 10^{-2} \quad (R^2 = 0,9998) \quad (\text{Ec. 2.4})$$

## 2.2.5 Análisis microbiológicos

La caracterización microbiológica de la miel de abejas y el polen apícola se realizó según las metodologías recopiladas en la “*Guía de referencias de métodos horizontales de análisis microbiológicos para bebidas, alimentos y alimentos para animales*” del Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación – ICNTEC (GTC 125, 2005). Esta caracterización incluyó el recuento de coliformes totales y fecales (NMP/g) mesófilos aerobios (UFC/g) y mohos y levaduras (UFC/g) para ambas materias primas.

## 2.2.6 Recuento de células viables de levadura

Inicialmente se realizó un recuento de células viables del cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleada. Para ello se suspendió 0,4 g/L de levadura liofilizada en 50 ml de agua potable estéril a 39°C durante 20 minutos agitando suavemente. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas de esta suspensión ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) en solución salina isotónica (NaCl 0,85%) y se sembró 0,1 mL de cada dilución en medios de cultivo YPD sólidos (extracto de levadura, peptona, dextrosa, agar nutritivo) por el método

de extendido en placa por triplicado. La incubación de las placas se llevó a cabo a 25°C durante 3 días, posterior a los cuales se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) y se calculó el recuento celular en UFC/mL (Ecuación 2.5):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Factor de dilución} * 0,1 \text{ mL}} \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Para el monitoreo del crecimiento celular durante la fermentación alcohólica mediante recuento de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* se realizaron diluciones sucesivas de la muestra del mosto fermentativo ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) en agua peptonada (NaCl 0,85%, peptona 0,1%) y se adicionó 1 mL de cada dilución en medios de cultivo YPD agarizados (extracto de levadura, peptona, dextrosa, agar nutritivo) por el método de inmersión en placa por duplicado. La incubación de las placas se llevó a cabo a 25°C durante 7 días, posterior a los cuales se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) y se calculó el recuento celular en UFC/mL (Ecuación 2.6):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Factor de dilución}} \quad (\text{Ec. 2.6})$$

### 2.2.7 Evaluación sensorial

El análisis sensorial de la miel de abejas, polen apícola e hidromieles se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial de Alimentos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimento – ICTA de la Universidad Nacional de Colombia con la participación de ocho jueces entrenados en la evaluación de estos productos. Durante las sesiones, los panelistas se encontraron aislados entre sí y disponían de agua sin gas y galletas *crackers* para limpiar la lengua y reducir la interferencia de una muestra sobre la evaluación de la siguiente.

En el caso de la miel de abejas el análisis sensorial se realizó siguiendo las metodologías reportadas por Piana et al. (2006) para la evaluación descriptiva de aspectos visuales (estado físico, apariencia y color), olfativos (intensidad de olor) y olfato-gustativos (intensidad de aroma, descripción de olor y aroma e intensidad de sabores básicos) y para la evaluación cuantitativa de defectos de olor y aroma (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de miel de abejas

<b>Parámetros sensoriales</b>	<b>Característica</b>	<b>Niveles</b>
Visuales	Estado físico	Líquido, líquido/cristalizado, cristalizado
	Apariencia <i>Separación de fases</i> <i>Translucidez</i> <i>Impurezas</i>	Homogénea, no homogénea Limpia, turbia Ausencia, presencia
	Color <i>Intensidad</i> <i>Tono</i>	Muy claro, claro, medio, oscuro, muy oscuro Amarillo paja, ámbar, ámbar oscuro, negra
Olfativos	Intensidad de olor	Nulo, débil, medio, fuerte
Olfato-gustativos	Intensidad de sabores básicos (dulce, ácido, amargo)	Nula, débil, medio, fuerte
	Intensidad de aroma	Nulo, débil, medio, fuerte
	Descripción de olor y aroma	Rueda de descriptores de olores y aromas para la miel de abejas (Piana et al., 2006)

De igual manera, el análisis sensorial del polen incluyó la evaluación de las características visuales, olfativas y olfato-gustativas (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de polen apícola

<b>Parámetros sensoriales</b>	<b>Característica</b>	<b>Niveles</b>
Visuales	Color	Monocolor, multicolor
	Impurezas visuales	Ausencia, presencia
Olfativos	Intensidad de olor	Débil, medio, alto
	Descripción del olor	
Olfato-gustativos	Intensidad de sabores básicos (dulce, ácido, amargo)	Nulo, débil, medio, alto

La determinación de defectos presentes en la miel de abejas y en polen apícola se realizó utilizando escalas no estructuradas de 10 cm para la evaluación de la intensidad de características asociadas a olores y/o aromas de fermentación, ahumado, humedad o

moho y metálico para la miel de abejas y a humedad, rancidez, amargor y fermentación para el polen apícola.

La metodología implementada para el análisis sensorial de los hidromieles se basó en las técnicas y consideraciones para la cata de vinos descritas por Jackson (2009) y en el sistema de grados de calidad para vinos sugerida por Etaio et al. (2007), lo cual se complementó con las instrucciones contempladas en la guía para el entrenamiento de jueces para la evaluación de hidromieles del “Programa de Certificación de Jueces Cervecedores” (Strong et al., 2014). De esta manera se diseñó un formato de evaluación de los parámetros visuales, olfativos y gustativos más relevantes para el hidromiel (Tabla 2-3), que están relacionados con criterios de calidad durante el proceso productivo.

Tabla 2-3: Características sensoriales evaluadas durante el análisis sensorial de hidromiel

<b>Parámetros sensoriales</b>	<b>Característica</b>	<b>Niveles</b>
Visuales	Limpidez	Turbio, limpio
	Tono	Amarillo claro, amarillo, amarillo quemado, ocre, café, ámbar
	Intensidad del color	Débil, ligero, medio, fuerte
Olfativos	Intensidad de olor	Escala de 7 puntos
	Descripción del olor	
	Intensidad de aroma	Escala de 7 puntos
	Descripción del aroma	
	Defectos de olor y aroma	Láctico, moho, herbáceo, picado, oxidado, huevos podridos, lías (levaduras), sulfuroso, cocido
	Persistencia aromática global	Escala de 7 puntos
Gustativos	Intensidad de dulzor, acidez, alcohol y amargor	Escala de 7 puntos
	Aristas	Dulzor, acidez, alcohol
	Cuerpo y equilibrio	Escala de 7 puntos

La evaluación de la intensidad de olor y de aroma, la persistencia global, la intensidad de dulzor, acidez, alcohol y amargor y el cuerpo y equilibrio fueron evaluadas utilizando una

escala estructurada de siete puntos que representan los grados de calidad para vinos sugeridas por Etaio et al. (2007) (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Descripción de los grados de calidad para la evaluación de algunas características sensoriales de los hidromieles

Escala	Grado de calidad	Descripción		
		<i>Intensidad de olor, aroma, dulzor, acidez, alcohol y amargor</i>	<i>Persistencia global</i>	<i>Cuerpo y equilibrio</i>
1	Nula	No se aprecia	<i>Aparición o persistencia de defectos graves</i>	Totalmente desequilibrado: varias aristas importantes o una muy importante
2	Muy baja	Intensidad muy baja	<i>Aparición o persistencia de defectos leves</i>	Bastante desequilibrado: varias aristas o una importante
3	Baja	Intensidad baja	<i>Persistencia inferior a 5 segundos</i>	Alguna ligera arista y cuerpo medio o bajo
4	Media	Intensidad media	<i>Persistencia de 5 a 7 segundos sin defectos</i>	Equilibrado y con cuerpo bajo o alguna ligera arista pero cuerpo alto o muy alto
5	Alta	Intensidad alta	<i>Persistencia de 9 a 10 segundos sin defectos</i>	Equilibrado y con cuerpo medio
6	Muy alta	Intensidad muy alta	<i>Persistencia de 11 a 13 segundos sin defectos</i>	Equilibrado y con cuerpo alto
7	Máxima	Intensidad máxima	<i>Persistencia de 14 segundos sin defectos</i>	Equilibrado y con cuerpo muy alto

Los formatos utilizados para la evaluación sensorial de la miel de abejas, del polen apícola y de los hidromieles se encuentran en el Anexo D.

## 2.3 Experimentación

La experimentación llevada a cabo en este proyecto constó de tres fases a lo largo de las cuales se llevó a cabo la optimización y el modelamiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas. Como sustratos de fermentación se utilizó miel de abejas como fuente de carbohidratos y polen apícola como fuente principal de nitrógeno asimilable por la levadura. A continuación se describen cada una de estas fases.

### 2.3.1 Microfermentaciones en laboratorio (0,2 L)

En esta primera fase de experimentación se evaluó el efecto de la concentración de azúcares (glucosa y fructosa) y del contenido de nitrógeno asimilable por la levadura (NAL) en la fermentación alcohólica de miel de abejas según un diseño factorial completo con dos factores y tres niveles –  $3^2$ . El contenido de azúcares se ajustó con la concentración de miel de abejas y el de NAL con la de polen apícola en el medio fermentativo. Los niveles para la concentración de azúcares en el medio se definieron a partir de investigaciones científicas previas sobre fermentación alcohólica de miel de abejas, en donde una concentración de 24% de azúcares es recomendada (Cuenca, Fuenmayor, Benedetti, & Buratti, 2015; C. Hernández, Blanco, & Quicazán, 2014). Varios autores están de acuerdo en que el nivel mínimo de nitrógeno asimilable por la levadura requerido para evitar fermentaciones lentas o atascadas se encuentra alrededor de 120-150 mg N/L en mostos de uvas (Alexandre & Charpentier, 1998; Muik, Edelmann, Lendl, & Ayora-Cañada, 2002; O’Kennedy & Reid, 2008). También se ha demostrado que la adición de 120 mg/L de NAL utilizando polen apícola en la fermentación alcohólica de miel de abejas permitió obtener hidromieles con un grado alcohólico de 12%, con baja acidez volátil y bajo contenido de azúcares residuales, mejorando la cinética de la fermentación alcohólica y las características organolépticas del producto (Roldán et al., 2011). Por ello, se consideró un nivel de 130 mg/L como valor de referencia para el contenido de nitrógeno asimilable por la levadura, a partir del cual se fijaron los niveles inferior y superior. La Tabla 2-5 contiene la información sobre los factores y niveles evaluados en el diseño experimental planteado.

Tabla 2-5: Factores y niveles en el diseño factorial completo  $3^2$ 

Factor		Niveles		
		-	0	+
A	Azúcares fermentables (%m/m)	22	27	32
B	Nitrógeno asimilable por la levadura (mg-N/L)	65	130	195

A partir de los factores y niveles establecidos, se construyó la matriz de diseño de experimentos con la que se definieron los tratamientos o ensayos realizados (Tabla 2-6).

Tabla 2-6: Matriz de diseño con los tratamientos e interacción entre factores

Tratamientos	Factores principales		Interacción
	A	B	AB
$T_{ij}$			
$T_{00}$	-	-	+
$T_{01}$	-	0	0
$T_{02}$	-	+	-
$T_{10}$	0	-	0
$T_{11}$	0	0	0
$T_{12}$	0	+	0
$T_{20}$	+	-	-
$T_{21}$	+	0	0
$T_{22}$	+	+	+

El subíndice  $i$  representa el nivel del factor A y  $j$  el del factor B.

### Preparación de los mostos fermentativos

Se preparó cada uno de los tratamientos de la Tabla 2-6 pesando las cantidades de miel de abejas y de polen apícola requeridas para lograr la concentración de azúcares (glucosa y fructosa) y de NAL correspondientes a cada uno de los niveles mostrados en la Tabla 2-5 y diluyendo con agua potable. No se ajustó el pH inicial de ninguno de los medios fermentativos según lo recomendado por Hernández et al. (2014) para elaboración de hidromieles y éstos se pasteurizaron en recipientes de vidrio de 200 mL mediante calentamiento a 65°C durante 20 minutos en un baño termostático y enfriamiento súbito en un baño de agua fría.

### **Preparación del inóculo de levadura**

La preparación y adición del inóculo de levadura a los mostos fermentativos se realizó siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante contenidas en la ficha técnica del microorganismo (Anexo A), utilizando una relación de 0,4 g/L de levadura.

### **Condiciones de fermentación**

Los recipientes con los medios inoculados fueron cubiertos con gasa estéril y colocados en una incubadora a 25°C, en donde se llevó a cabo la fermentación alcohólica durante 20 días. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

### **Análisis pos-fermentativos**

Al final de la fermentación alcohólica se llevó a cabo la medición de la concentración de nitrógeno asimilable por la levadura y del contenido de glucosa, fructosa, glicerol y etanol en cada uno de los tratamientos según las metodologías descritas y se calculó el rendimiento etanol/azúcares ( $Y_{e/a}$ ) en cada tratamiento.

### **2.3.2 Fermentaciones en laboratorio (3 L)**

Esta fase de experimentación se llevó a cabo en un reactor de 3 L construido en acero inoxidable SS-316 que cuenta con sistema de agitación con impulsor de turbina *Rushton* con cuatro aspas planas, deflectores, acometida para la toma de muestras y escape de gases, pozo para termocupla, manta de calentamiento y electrodo en vidrio para la medición de pH. Este sistema también cuenta con un tablero para el control de la temperatura y la velocidad de agitación y el monitoreo en línea de pH (Figura 2-1).

Figura 2-1: Bioreactor de 3 L utilizado para el modelamiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas



La preparación del medio de cultivo y del inóculo de levadura se realizó según el procedimiento descrito en la fase anterior. Las concentraciones de azúcares (glucosa y fructosa) y de NAL correspondieron a los valores encontrados durante la optimización del rendimiento con base en los resultados de la primera fase. Durante la fermentación alcohólica se tomaron muestras periódicas durante 11 días y se determinaron pH, sólidos solubles totales, nitrógeno asimilable por la levadura, glucosa, fructosa, glicerol, etanol y recuento celular según las metodologías descritas, para el modelamiento de las cinéticas de consumo de sustratos, producción de metabolitos y crecimiento celular. Se realizó también la medición de la acidez volátil y el análisis sensorial de los hidromieles finales. La fermentación en esta etapa se realizó por duplicado.

### 2.3.3 Fermentación en lotes a escala piloto (100 L)

La tercera fase de experimentación se llevó a cabo en el municipio de Rivera en el departamento de Huila con el apoyo de la Cooperativa de Apicultores del Huila (COAPI), la cual cuenta con una planta piloto para la producción de hidromiel con una capacidad nominal de 100 L. Esta planta consta de una marmita con chaqueta térmica con sistemas de calentamiento a gas y de agitación eléctrica con impulsor tipo *Rushton* de cuatro aspas planas, un fermentador de fondo cónico y dos tanques de almacenamiento. Todos los

equipos están contruidos en acero inoxidable SS-316 con acabado alimenticio (Figura 2-2).

Figura 2-2: Vista de la planta piloto para producción de hidromiel en el municipio de Rivera (Huila)



La preparación del mosto fermentativo se realizó teniendo en cuenta las condiciones óptimas de concentración de azúcares (glucosa y fructosa) y NAL encontradas para el rendimiento. Para ello se adicionaron la miel de abejas, el polen apícola y el agua potable a la marmita. Se encendieron los sistemas de calentamiento y de agitación para homogenizar el medio fermentativo y alcanzar una temperatura de 65°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se suspendió el calentamiento y luego de 20 minutos se encendió el sistema de enfriamiento de la marmita mediante la circulación de agua fría a través de la chaqueta de la misma hasta alcanzar una temperatura cercana a los 25°C. Posteriormente, se transfirió el mosto fermentativo pasteurizado al fermentador.

La preparación y adición del inóculo de levadura al fermentador se realizó según las instrucciones y recomendaciones del fabricante dadas en la ficha técnica de la levadura (Anexo A), utilizando una relación de 0,4 g/L de levadura.

La fermentación alcohólica durante esta fase se realizó a condiciones ambientales (bulbo húmedo: 18-28°C, humedad relativa: 66%) y se realizó el monitoreo periódico de la misma durante 14 días tomando muestras cada 24 horas y midiendo pH, contenido de sólidos solubles totales, NAL, glucosa, fructosa, glicerol y etanol según las metodologías descritas. Adicionalmente, se llevó a cabo la medición de la acidez volátil y el análisis sensorial del hidromiel final.

## 2.4 Análisis estadístico y modelamiento

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el software SAS® 9.4 TS Level 1M1 (SAS Inc., USA) mediante la validación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad a través de los test de Bartlett y Levene, un análisis de varianza (ANOVA) de varios factores y una prueba de comparación múltiple de los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Se realizó un análisis mediante superficies de respuesta y curvas de nivel para encontrar valores óptimos de las variables estudiadas en el rango de experimentación y se obtuvieron modelos de regresión para el rendimiento etanol/azúcares de la fermentación alcohólica y otras variables del proceso. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significancia de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). El modelamiento de los datos cinéticos y la validación de la significancia de los mismos se realizó utilizando el software OriginPro 2017 (OriginLab, USA).

## 3. Resultados

### 3.1 Caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de las materias primas

La miel de abejas utilizada presentó unas condiciones fisicoquímicas y microbiológicas adecuadas que permitieron su utilización como materia prima para la elaboración de hidromiel, dada su alta concentración de sólidos solubles totales (grados Brix), mayoritariamente glucosa y fructosa, y a los bajos recuentos microbianos encontrados (Tabla 3-1).

Tabla 3-1: Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la miel de abejas

Parámetro	Valor	Límites
Grados Brix	78,0 ± 0,25	-
Glucosa (g/100g)	36,6 ± 0,4	> 60
Fructosa (g/100g)	40,4 ± 0,3	
Humedad (%)	19,9 ± 0,2	< 20
pH	3,53 ± 0,03	-
Acidez libre (meq/kg)	52,8 ± 1,4	< 50
Cenizas (g/100g)	0,16 ± 0,04	< 0,6
Coliformes totales (NMP/g)	<3	-
Coliformes fecales (NMP/g)	<3	-
Mesófilos aerobios (UFC/g)	<10	< 100
Mohos y levaduras (UFC/g)	30	< 100

En Colombia, la Resolución 1057 de 2010 que establecía los requisitos de calidad fisicoquímica y microbiológica de la miel de abejas fue derogada. Por tanto, se realizó la comparación de estas características de la miel de abejas con los límites de referencia estipulados en el Codex Norma (CODEX STAN 12-1981, 2001) y la Norma Salvadoreña para la miel de abejas (NSO 67.19.01, 2008), confirmando que la miel de abejas empleada cumple todos los requisitos de calidad fisicoquímica y microbiológica con excepción de la acidez libre. Se ha reportado que altos valores de este parámetro pueden estar

relacionados con el origen floral y las condiciones climáticas durante la temporada de cosecha, aunque también puede ser producto del inicio de la fermentación de la miel (Perez-Arquillué, Conchello, Ariño, Juan, & Herrera, 1994)

Entre los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del polen apícola (Tabla 3-2) se destaca una fracción importante de azúcares fermentables (32%p/p) y un alto contenido de proteína que se encuentra alrededor de lo reportado para pólenes de distintas regiones de Colombia (Fuenmayor et al., 2014; Zuluaga, Díaz Moreno, & Quizacán, 2011). Se encontró una relación de nitrógeno asimilable por la levadura que corresponde al 6% del contenido de nitrógeno total presente en el polen. Roldán et al., (2011) determinaron el contenido de nitrógeno asimilable de un polen comercial español con un contenido de proteína de 15,7% y de nitrógeno total de 2,52%, encontrando una concentración aproximadamente de 2,3 mg N/g, la cual representa el 9% del nitrógeno total presente en el polen, similar a lo encontrado en este trabajo.

Tabla 3-2: Caracterización fisicoquímica y microbiológica del polen apícola

Parámetro	Valor	Referencias		
		Colombia	Brasil <sup>1</sup>	México <sup>2</sup>
Glucosa (g/100g)	12,2 ± 0,1	11,6 – 20,3	-	-
Fructosa (g/100g)	20,0 ± 0,1	18,1 – 21,3	-	-
Humedad (g/100g)	4,2 ± 0,1	1,8 – 11,8	< 4	4,5 – 8
pH	4,16 ± 0,16	3,8 – 5,4	4 – 6	<4
Acidez total (meq/kg)	324,8 ± 12,1	155 – 402	< 300	-
Proteína (g/100g)	25,9 ± 0,3	16,1 – 32,1	> 8	12 – 18
Nitrógeno asimilable (mg N/g)	2,56 ± 0,20	-	-	-
Lípidos (g/100g)	6,8 ± 0,4	2,8 – 9,7	> 1,8	2,5 – 6,5
Cenizas (g/100g)	2,64 ± 0,01	1,5 – 3,2	< 4	1,5 – 2,2
Mesófilos aerobios (UFC/g)	2900	-	-	< 10000
Coliformes totales (UFC/g)	<3	-	-	
Coliformes fecales (UFC/g)	<3	-	0	
Mohos y levaduras (UFC/g)	570	-	< 100	< 300

<sup>1</sup>(Instrucción normativa N°3, 2001); <sup>2</sup>(NMX-FF-094-SCFI, 2007)

Fuenmayor et al. (2014) reportaron los valores mínimos y máximos de los principales parámetros fisicoquímicos del polen apícola proveniente del Altiplano Cundiboyacense, dentro de los cuales se encontraron todos los valores encontrados en la caracterización realizada. Sin embargo, al realizar la comparación con lo exigido por normas

internacionales para polen apícola (Instrucción normativa N°3, 2001; NMX-FF-094-SCFI, 2007), se encontró que el polen empleado no cumplió con los requisitos de pH y acidez total, y de proteína bajo la norma mexicana. Un mayor valor en la acidez del polen también puede relacionarse con el origen floral y las condiciones geográficas y climáticas de la región de cosecha, pues como se observa en la Tabla 3-2, se reportan valores alrededor de 400 meq/kg.

En cuanto a los requisitos microbiológicos se encontró que el polen apícola empleado cumplió con los límites establecidos por normas internacionales para mesófilos aerobios y coliformes totales y fecales. Sin embargo, este no cumplió con el requisito de mohos y levaduras.

Respecto al cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* empleado, éste presentó un recuento de células viables de  $2,45 \pm 0,32 * 10^6$  UFC/mL, demostrando una alta viabilidad del inóculo.

En cuanto al análisis sensorial, los resultados para la miel de abejas mostraron que:

- La muestra evaluada presentó un estado físico líquido, sin separación de fases y sin presencia de impurezas o materiales extraños que afectaran su translucidez.
- La cuantificación de las intensidades para los defectos de olor y aroma (fermentación, ahumado, metálico y humedad) presentó valores por debajo de la unidad en todos los casos. Esta evaluación permite afirmar que la miel de abejas no sufrió contaminación por malas prácticas durante su cosecha y manipulación. Por tanto, el hecho de que la acidez libre se haya encontrado por encima del límite máximo permitido puede atribuirse a características propias de la miel relacionadas con su origen floral y geográfico y/o condiciones climáticas durante la cosecha.
- La miel de abejas presentó un color con tonos entre amarillo paja y ámbar (Figura 3-1), con una intensidad de color media (Figura 3-2). Respecto a los parámetros olfativos, la miel de abejas presentó un olor y aroma de intensidad media (Figura 3-3) descrito como floral, frutal, fruta madura, cálido y caramelo, con una intensidad del sabor dulce entre media y fuerte, una acidez entre débil y nula y un amargor nulo (Figura 3-4).

Figura 3-1: Evaluación del tono de la miel de abejas

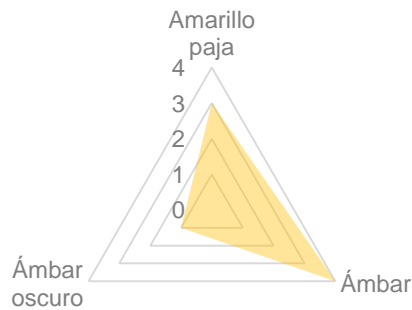


Figura 3-3: Evaluación de la intensidad de olor y aroma de la miel de abejas

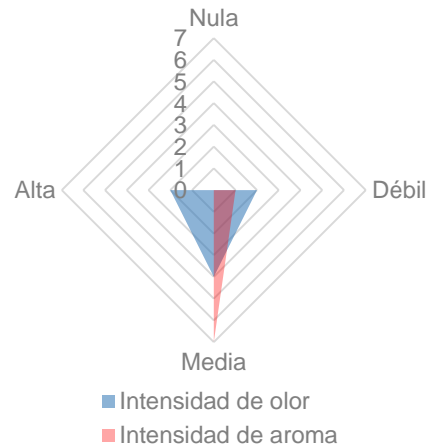


Figura 3-2: Evaluación de la intensidad del color de la miel de abejas

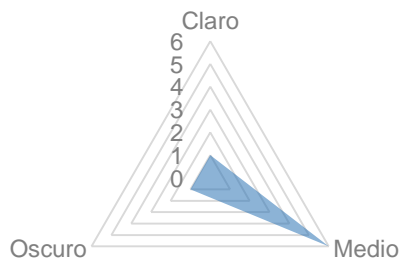
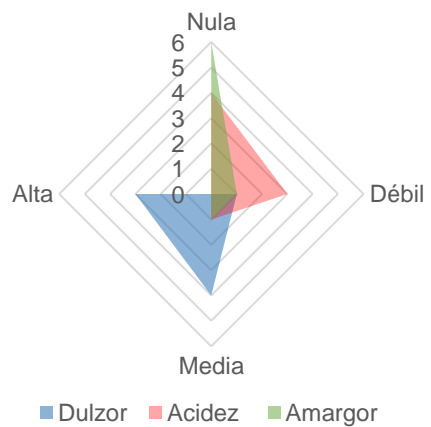


Figura 3-4: Evaluación de la intensidad de sabores básicos de la miel de abejas

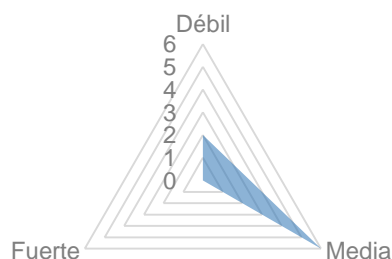


El análisis sensorial del polen apícola mostró los siguientes resultados:

- La muestra evaluada correspondió a un polen apícola multicolor, con tonos predominantemente amarillos y naranjas, sin presencia notoria de impurezas macroscópicas o materiales extraños.

- La intensidad del olor del polen apícola correspondió a un nivel medio (Figura 3-5), con un perfil descriptivo predominantemente floral, frutal, proteico y herbáceo, con matices de tostado, dulce y eucalipto.

Figura 3-5: Evaluación de la intensidad de olor del polen apícola



- El polen presentó una intensidad media para el sabor dulce, una acidez débil y un amargo no perceptible, definiéndose como un producto aceptable y agradable sensorialmente (Figura 3-6). En este mismo sentido, la intensidad de percepción de defectos sensoriales fue muy baja (Figura 3-7), confirmando que la acidez elevada encontrada a nivel fisicoquímico puede estar relacionada con el origen y las condiciones de cosecha del polen y no con problemas de calidad.

Figura 3-6. Evaluación de la intensidad de sabores básicos del polen apícola

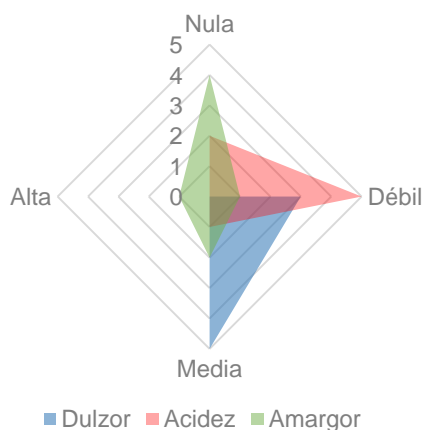
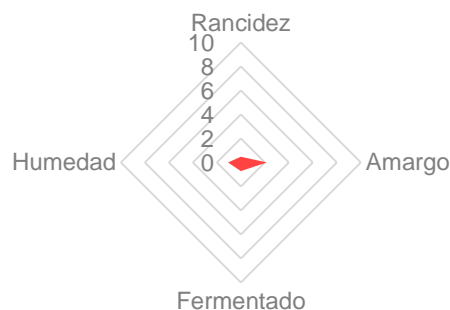


Figura 3-7: Evaluación de defectos de olor y aroma del polen apícola



Los niveles de los diagramas radiales representan la frecuencia de las respuestas dadas por los panelistas para cada atributo organoléptico.

## 3.2 Microfermentaciones alcohólicas

En esta fase del estudio se evaluaron distintos aspectos de la fermentación alcohólica a partir de los tratamientos planteados en la Tabla 2-6. La información completa del diseño experimental, los datos recopilados y los resultados completos se incluye en el Anexo E.

### Comparación de tratamientos para la fermentación alcohólica

Los modelos planteados para el análisis estadístico de los resultados para el contenido de azúcares residuales totales (ART), concentración residual de nitrógeno asimilable por la levadura (NAL), contenido de etanol y de glicerol y rendimiento etanol/azúcares fueron significativos, presentando distribución normal con media cero y homocedasticidad en los residuos, por lo cual es posible realizar inferencia estadística sobre los resultados obtenidos en esta fase de experimentación. Los resultados detallados del análisis estadístico realizado se presentan en el Anexo F.

Se encontraron diferencias significativas para todas las variables independientes evaluadas; además, los factores (concentración inicial de azúcares y nitrógeno asimilable) y la interacción entre ellos tuvieron efecto significativo sobre estas, logrando explicar en todos los casos más del 93% de la varianza sobre la variable de respuesta. Los coeficientes de variación encontrados en todos los modelos estuvieron dentro del 5% admitido en trabajos de experimentación en laboratorio.

En todos los ensayos realizados a concentraciones de 22% y 27% de azúcares (glucosa y fructosa), el consumo de éstos fue total (Tabla 3-3), siendo mejor los tratamientos al nivel más bajo debido a los más altos rendimientos encontrados. Caso contrario ocurrió con los ensayos a 32%, los cuales presentaron un contenido de azúcares residuales que representa el 12% del contenido inicial de azúcares, principalmente fructosa. Esta situación es indeseable en la producción de hidromiel pues incrementa el riesgo de contaminación del hidromiel y/o re-fermentación en botella, así como también altera el perfil organoléptico buscado en este producto, que corresponde al de un vino seco.

Tabla 3-3: Concentraciones finales de ART (glucosa y fructosa), NAL, etanol, glicerol y rendimiento de las fermentaciones alcohólicas.

Tratamiento	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	ART (g/L)	NAL (mg/L)	Etanol (%v/v)	Glicerol (g/L)	$Y_{e/a}$ (g/g)
T00	0	0	0	49,8 ± 2,6	13,2 ± 0,4 <sup>bc</sup>	8,5 ± 0,4 <sup>d</sup>	0,447 ± 0,014 <sup>b</sup>
T01	0	0	0	108,9 ± 6,1	15,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,518 ± 0,026 <sup>a</sup>
T02	0	0	0	183,0 ± 4,8	12,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	9,7 ± 0,4 <sup>cd</sup>	0,408 ± 0,003 <sup>bc</sup>
T10	0	0	0	57,9 ± 3,9	14,5 ± 0,3 <sup>ab</sup>	10,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,399 ± 0,009 <sup>c</sup>
T11	0	0	0	128,2 ± 4,3	12,9 ± 1,0 <sup>c</sup>	9,3 ± 1,0 <sup>cd</sup>	0,344 ± 0,025 <sup>d</sup>
T12	0	0	0	169,0 ± 3,0	15,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,400 ± 0,016 <sup>c</sup>
T20	7,4 ± 1,2	40,3 ± 3,8	47,7 ± 4,9	63,4 ± 0,0	14,7 ± 0,5 <sup>ab</sup>	13,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,393 ± 0,011 <sup>c</sup>
T21	5,5 ± 0,4	34,4 ± 2,4	39,9 ± 2,8	116,2 ± 2,6	15,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,386 ± 0,003 <sup>cd</sup>
T22	4,1 ± 0,3	35,3 ± 3,0	39,4 ± 3,3	195 ± 0,0	15,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	14,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,387 ± 0,012 <sup>cd</sup>

Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos

En términos generales, se encontró que el consumo de nitrógeno asimilable por la levadura fue bajo. Los mayores consumos de nitrógeno asimilable se encontraron en los ensayos con menor concentración inicial de azúcares en los niveles más bajos NAL (T00 y T01), junto con el ensayo T12, insinuando una mayor incapacidad para asimilar estos compuestos a mayores concentraciones de sustratos. Estos valores máximos estuvieron entre 13-23% de la concentración inicial de NAL, que corresponden a sólo el 22% y 18% del nivel mínimo recomendado en la literatura para la producción de vinos. En otros tratamientos el consumo de nitrógeno asimilable fue muy bajo (ensayos T11 y T20) e incluso nulo (ensayo T22).

Lo anterior indica una suplementación excesiva de nitrógeno asimilable, incluso en el nivel más bajo evaluado. Este hecho puede estar asociado con otros compuestos y nutrientes esenciales aportados por el polen apícola y que son esenciales para la levadura, como minerales, aminoácidos, ácidos orgánicos, sales, que pueden potenciar su metabolismo implicando un menor consumo de nitrógeno. Cabe anotar también que el requerimiento de nitrógeno es una característica que depende de la cepa de levadura empleada y por tanto es un parámetro que debe determinarse para cada microorganismo. En este caso, según el fabricante de la levadura utilizada, ésta es una cepa que tiene un bajo requerimiento de nitrógeno, lo que parece corroborarse con los resultados obtenidos.

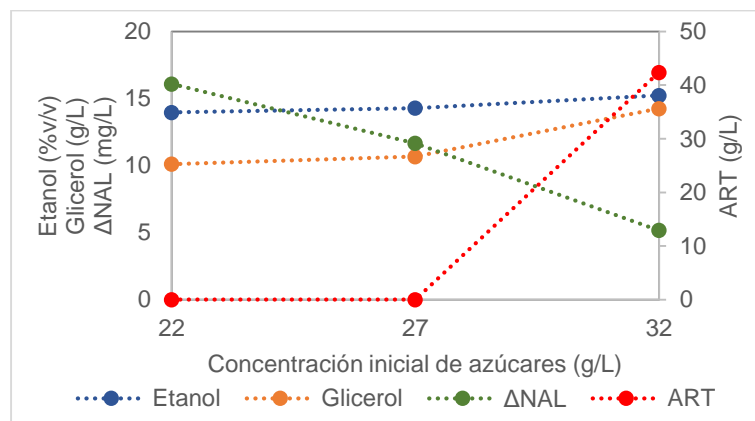
Todos los hidromieles obtenidos presentaron altos valores para el contenido de etanol, por encima de 11%v/v, lo cual representa un resultado favorable pues minimiza el riesgo de contaminación por bacterias acéticas y aumenta el tiempo de conservación en botella. Un estudio realizado en República Checa utilizando levaduras de la misma cepa empleada en este trabajo (*Saccharomyces cerevisiae* var. *Bayanus*) mostró también altos contenidos de etanol (13,6-17,5%v/v) y altos rendimientos etanol/azúcares (0,42-0,56 g/g) para las fermentaciones de mostos de miel con 280 g/L de azúcares a 24°C (Bénes, Furdíková, & Šmogrovicová, 2015). Los resultados obtenidos para el contenido de etanol y los reportados por Bénes et al. (2015) confirman la tolerancia a altas concentraciones de esta cepa de levadura, según lo indicado en la ficha técnica del fabricante. A nivel sensorial, un contenido de etanol elevado puede generar un impacto negativo sobre la apreciación de las demás características sensoriales y la calificación general del hidromiel, al estar relacionado una sensación térmica en boca que puede resultar desagradable para el consumidor, sobre todo si no se presta atención a otras características como el cuerpo y el balance con la acidez y el dulzor.

Los mayores rendimientos se obtuvieron para los ensayos con el nivel más bajo de azúcares para todas las concentraciones de NAL, es decir, T00, T01 y T02, y significativamente más alto para el ensayo T01, que presentó también el mayor contenido alcohólico. Estos resultados fueron similares a lo reportado en un estudio previo utilizando la misma cepa de levadura para la fermentación alcohólica de mostos de miel de abejas a 24°Brix y 30°C utilizando polen apícola como fuente de nitrógeno (Hernández, Serrato, & Quicazan, 2015). Por el contrario, aunque el consumo de azúcares haya sido total en los ensayos T10, T11 y T12 y se hayan alcanzado valores altos para el grado alcohólico, la conversión de los azúcares presentes en etanol no fue eficiente. Esto se observa en los bajos valores del rendimiento, sugiriendo que parte del sustrato pudo destinarse a actividades de mantenimiento o a la producción de metabolitos secundarios debido a condiciones de estrés osmótico en el mosto fermentativo (alta concentración de azúcares y de nitrógeno, turbidez por efecto de la adición de polen). Este resultado es aún más evidente en los ensayos T20, T21 y T22, donde el nivel de azúcares en el medio fue más alto. De igual manera se observa que aunque estos hidromieles presentaron un alto contenido de etanol, la producción de glicerol, un metabolito asociado a condiciones de estrés osmótico (Novo et al., 2014), fue significativamente más elevada.

El glicerol es un compuesto sensorialmente importante en los vinos puesto que se asocia con el cuerpo del mismo y contribuye a suavizar las sensaciones en la boca, aportando también sabor dulce (Jackson, 2009). El contenido de glicerol en los vinos suele variar entre 3-15 g/L, con un valor promedio alrededor de 7 g/L (Jackson, 2009; Scanes, Hohmann, & Prior, 1998). Todos los hidromieles obtenidos en esta fase presentaron contenidos de glicerol dentro de este rango y en valores comparables con los encontrados en vinos.

Se encontró que el consumo de nitrógeno disminuye a medida que aumenta la concentración inicial de azúcares en el mosto, así como un aumento en la concentración de azúcares residuales totales (Figura 3-8). Este aumento se correlaciona con una estimulación en la producción de glicerol como se discutió anteriormente, mientras que el contenido de etanol no varió de manera muy marcada, sugiriendo nuevamente que en condiciones de estrés osmótico las células de levadura optan hacia la producción de glicerol.

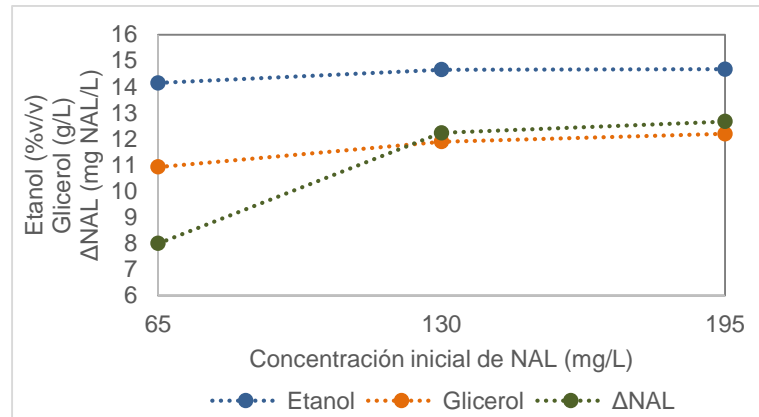
Figura 3-8: Efecto del contenido inicial de azúcares (glucosa y fructosa) en el mosto fermentativo sobre la producción de etanol y glicerol y consumo de azúcares y NAL



También se observó un incremento en el consumo de compuestos nitrogenados cuando se aumentó la concentración inicial de nitrógeno asimilable en el mosto de fermentación de 65 mg/L a 130 mg/L, y luego se mantuvo estable. Por otro lado, no parece haber una relación muy estrecha entre el contenido de NAL en el mosto y la producción de etanol y glicerol (Figura 3-9). Esto muestra que altas concentraciones de nitrógeno en el medio de fermentación no afectan negativamente la proporción de etanol y glicerol producido

durante la fermentación alcohólica. En la Tabla 3-3 se observa que el contenido de ART no depende de la concentración inicial de NAL, sino exclusivamente del de azúcares.

Figura 3-9: Efecto del contenido inicial de nitrógeno asimilable por la levadura en el mosto fermentativo sobre la producción de etanol y glicerol y consumo de NAL

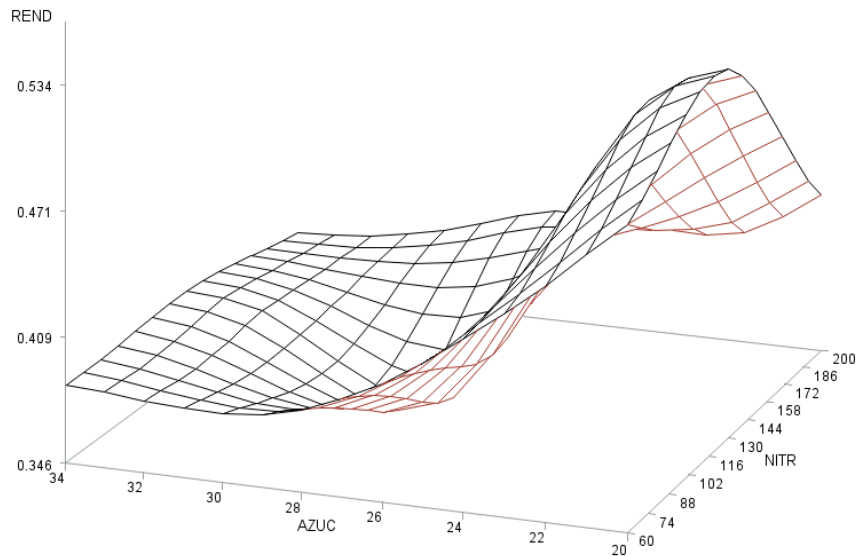


Lo anterior indica que las condiciones más favorables en cuanto al balance entre el consumo de sustratos (glucosa, fructosa y nitrógeno asimilable) y producción de alcoholes (etanol y glicerol) se encuentra hacia niveles medios del contenido inicial de NAL y hacia concentraciones iniciales bajas de azúcares fermentables en el rango evaluado. Esto se verificó llevando a cabo un análisis de optimización para maximizar el rendimiento ( $Y_{e/a}$ ) mediante la metodología de superficie de respuesta y curvas de nivel, teniendo en cuenta que estadísticamente ambos factores, así como la interacción entre ellos, presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

### Optimización de la concentración inicial de azúcares y nitrógeno asimilable

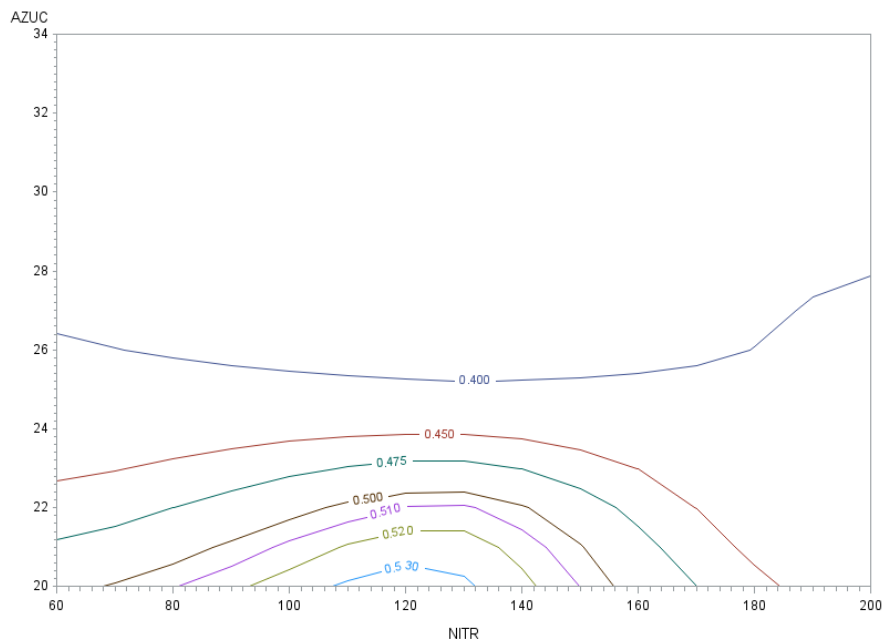
La superficie de respuesta obtenida (Figura 3-10) presentó un punto de inflexión para el rendimiento para el cual, dentro del rango de experimentación evaluado, se observó una condición mínima hacia valores más altos de la concentración de azúcares y bajos del contenido de NAL lo cual se correlacionó con los rendimientos mostrados en la Tabla 3-3, en donde los ensayos con 27% y 32% de azúcares iniciales mostraron los resultados significativamente más bajos.

Figura 3-10: Superficie de respuesta para la influencia del contenido de azúcares y NAL iniciales sobre el rendimiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas



Por otro lado, se encontró una región comprendida entre los niveles medios del contenido de NAL y bajos de la concentración de azúcares en la que el rendimiento exhibe un comportamiento creciente hasta alcanzar un máximo dentro del rango experimental examinado. Esto confirma las inferencias realizadas sobre las Figuras 3-8 y 3-9.

Figura 3-11: Superficies de respuesta para la influencia del contenido de azúcares y NAL iniciales sobre el rendimiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas



El gráfico de curvas de nivel (Figura 3-11) mostró que los mayores rendimientos para la fermentación alcohólica de miel de abejas se concentraron en el rango entre 20 y 24% de azúcares iniciales y entre 100 y 140 mg/L de nitrógeno asimilable por la levadura.

### Modelos de regresión

Se realizó un análisis de regresión en el software SAS 9.4 que permitió evaluar los parámetros del modelo para el rendimiento incluyendo los componentes lineales y cuadráticos de los factores evaluados con efecto significativo sobre la variable de respuesta. Se encontró que el modelo es estadísticamente significativo, con un coeficiente de determinación ajustado aceptable ( $R_{ajustado}^2 = 0,8973$ ). Los componentes de los factores evaluados (A: azúcares; N: nitrógeno asimilable) y las interacciones con efecto significativo, el estadístico de prueba y los estimadores de los parámetros del modelo se presentan en la Tabla 3-4.

Tabla 3-4: Estimadores de los parámetros del modelo de regresión para el rendimiento

Componentes del modelo	Valor p	Estimadores del modelo
Intercepto	<0,0001	0,40937
A <sub>L</sub>	<0,0001	-0,03411
A <sub>C</sub>	<0,0001	0,01396
A <sub>L</sub> N <sub>C</sub>	<0,0001	0,01569
A <sub>C</sub> N <sub>C</sub>	<0,0001	-0,01094

Las letras L y C indican los componentes lineal y cuadrático de los factores

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 3-4 se desarrolló el modelo de regresión para el rendimiento de la fermentación alcohólica (Ecuación 3.1) a partir de las condiciones iniciales de concentración de azúcares (glucosa y fructosa) y de nitrógeno asimilable por la levadura.

$$Y_e = -3,3015 \times 10^{-1} - 1,0357 \times 10^{-7} x_A^2 x_N^2 + 2,6929 \times 10^{-5} x_A^2 x_N + 6,3357 \times 10^{-6} x_A x_N^2 - 9,0027 \times 10^{-4} x_A^2 - 9,3833 \times 10^{-5} x_N^2 - 1,6473 \times 10^{-3} x_A x_N + 5,2252 \times 10^{-2} x_A + 2,4397 \times 10^{-2} x_N \quad (Ec. 3.1)$$

En donde  $x_A$  representa la concentración de azúcares fermentables (glucosa y fructosa) en %  $p/p$ ,  $x_N$  representa la concentración de nitrógeno asimilable por la levadura en  $mg/L$  y  $Y_{e/a}$  representa el rendimiento etanol/azúcares de la fermentación alcohólica en  $g_e/g_a$ .

A partir del modelo de regresión encontrado, se establecieron las condiciones óptimas para los factores evaluados que maximizaran el rendimiento de la fermentación empleando el software SAS 9.4. Los valores óptimos hallados fueron:

- Concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa): 22% m/m
- Concentración inicial de nitrógeno asimilable por la levadura: 123 mg/L
- Rendimiento etanol/azucars máximo estimado: 0,461

Las condiciones encontradas son similares a las recomendadas para la producción de hidromiel utilizando polen apícola: 20-22°Brix y 120 mg NAL/L (Roldán et al., 2011) y fueron evaluadas en las siguientes fases de experimentación en laboratorio y planta piloto.

De igual manera, se obtuvieron modelos de regresión para la estimación del contenido de azúcares residuales totales en  $g/L$  (Ecuación 3.2) ( $R_{ajustado}^2 = 0,9887$ ), la concentración final de NAL en  $mg/L$  (Ecuación 3.3) ( $R_{ajustado}^2 = 0,9934$ ), el contenido de etanol en %  $v/v$  (Ecuación 3.4) ( $R_{ajustado}^2 = 0,8082$ ) y el contenido de glicerol en  $g/L$  (Ecuación 3.5) ( $R_{ajustado}^2 = 0,9508$ ) en función de las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) en %  $p/p$  y de nitrógeno asimilable en  $mg/L$ .

$$ART = 81,2123 + 0,282356x_A^2 - 6,39745 \times 10^{-3}x_Ax_N - 10,1802x_A + 0,151406x_N \quad (Ec. 3.2)$$

$$NAL_f = 51,5001 + 3,7102 \times 10^{-5}x_A^2x_N^2 - 6,4451 \times 10^{-3}x_A^2x_N - 1,8542 \times 10^{-3}x_Ax_N^2 + 1,6385 \times 10^{-1}x_A^2 \\ + 2,2807 \times 10^{-2}x_N^2 + 3,2314 \times 10^{-1}x_Ax_N - 6,5712x_A - 3,0106x_N \quad (Ec. 3.3)$$

$$ETA = -33,8179 - 3,6555 \times 10^{-6}x_A^2x_N^2 + 9,5042 \times 10^{-4}x_A^2x_N + 2,1907 \times 10^{-4}x_Ax_N^2 - 5,1481 \times 10^{-2}x_A^2 \\ - 3,1890 \times 10^{-3}x_N^2 - 5,6957 \times 10^{-2}x_Ax_N + 3,2110x_A + 8,2914 \times 10^{-1}x_N \quad (Ec. 3.4)$$

$$GLI = -34,1463 - 3,8396 \times 10^{-6}x_A^2x_N^2 + 9,9830 \times 10^{-4}x_A^2x_N + 2,3138 \times 10^{-4}x_Ax_N^2 - 3,4030 \times 10^{-2}x_A^2 \\ - 3,3841 \times 10^{-3}x_N^2 - 6,0158 \times 10^{-2}x_Ax_N + 2,5899x_A + 8,8963 \times 10^{-1}x_N \quad (Ec. 3.5)$$

En el Anexo G se describe el procedimiento para la obtención de los modelos de regresión presentados en la tabla anterior.

### **3.3 Fermentaciones alcohólicas en bioreactor de 3 L**

En esta fase se realizó el monitoreo de la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala de laboratorio, en un bioreactor de 3 L bajo las condiciones óptimas de concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa) y de nitrógeno asimilable encontradas. A lo largo del proceso se midieron el pH, los grados Brix, el consumo de sustratos (glucosa, fructosa, nitrógeno asimilable), la producción de alcoholes (etanol y glicerol) y el crecimiento celular, así como la determinación de la acidez volátil de los hidromieles obtenidos. Los datos recopilados y los resultados completos se incluyen en el Anexo H.

#### **Monitoreo de la fermentación y caracterización de los hidromieles**

Se observó un descenso en los valores de los grados Brix (Figura 3-12) debido principalmente al consumo de azúcares (glucosa y fructosa), los cuales se estabilizaron a partir de las 160 horas de fermentación. Este resultado es mucho menor a los tiempos reportados por investigaciones previas realizadas dentro del grupo de investigación para fermentaciones utilizando polen apícola como fuente de nitrógeno: 192 horas (16°Brix, 1 g polen/L, 25°C) (Blanco et al., 2012), 240 horas (24°Brix, 4 g polen/L, 25°C) (Cuenca, Blanco, Pulido, & Serrato, 2014), 216-360 horas (24°Brix, 4 g polen/L, 25°C) (Hernández, Blanco, Cuenca, & Serrato, 2014), >216 horas (20-24°Brix, 4 g polen/L, 20-30°C) (Hernández, Blanco, & Quicazán, 2014) y 192 horas (24°Brix, 3,1 g/L, 30°C) (Hernández et al., 2015), así como lo reportado por Roldán et al., (2011). Estos autores encontraron que concentraciones de nitrógeno asimilable por la levadura mayores a 120 mg/L utilizando polen en la fermentación alcohólica de mostos de miel de abejas (20-22°Brix, 25°C) producen un incremento en la velocidad de fermentación, logrando tiempos alrededor de 240 horas y excepcionalmente de 48 horas cuando se suplementa el mosto con 168 mg/L de NAL. Se confirma por tanto que la adición de polen apícola disminuye el tiempo de fermentación alcohólica de miel de abejas bajo las condiciones evaluadas en este estudio.

Figura 3-12: Monitoreo de los grados Brix durante la fermentación alcohólica

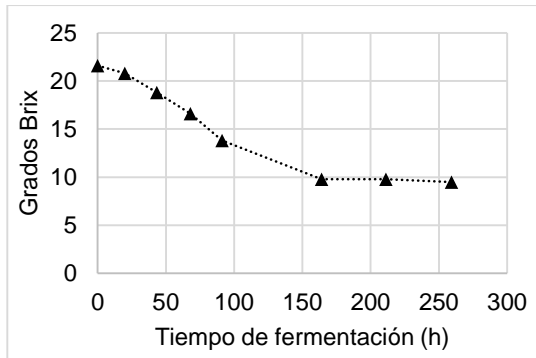
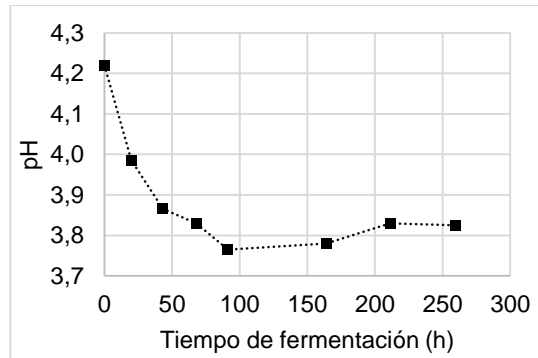


Figura 3-13: Monitoreo del pH durante la fermentación alcohólica



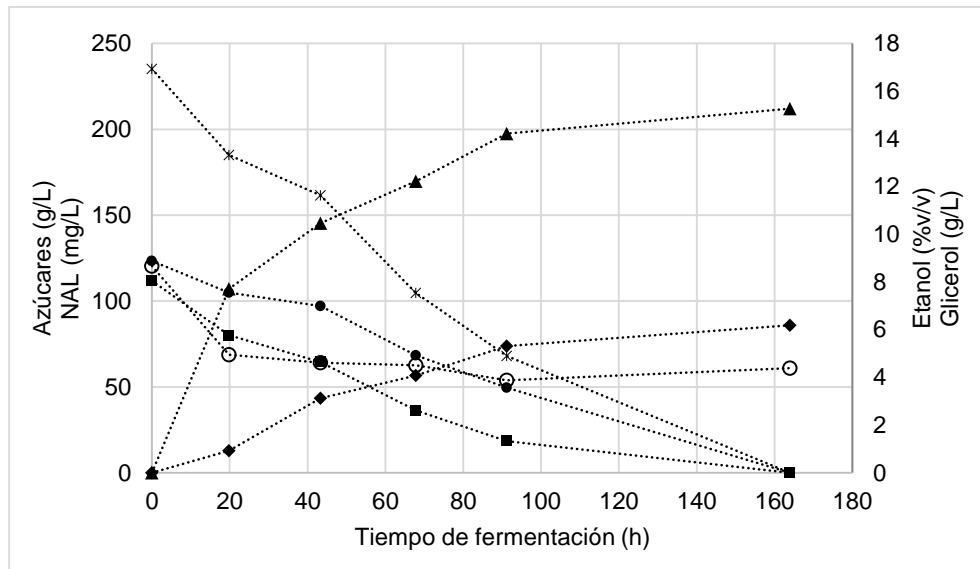
Por su parte, el pH del mosto disminuyó rápidamente de 4,22 a 3,76, alcanzando su valor más bajo y estabilizándose alrededor de las 100 horas de fermentación en el bioreactor (Figura 3-13). Este comportamiento se debe a la producción de ácidos orgánicos en los primeros días de fermentación, principalmente succínico y acético, y a la baja capacidad buffer de los mostos de miel de abejas (Sroka & Tuszyński, 2007). La rápida variación de la acidez puede tener un efecto antiséptico sobre el mosto fermentativo, ayudando a controlar el crecimiento de otros microorganismos, pero también puede extender la fase *lag* de crecimiento de las levaduras, reduciendo su velocidad de crecimiento o incluso causando su muerte (Sroka & Tuszyński, 2007).

En la Figura 3-14 se observa que el consumo de los azúcares (glucosa y fructosa), similar a lo ocurrido en la fase anterior, fue total, observándose un consumo simultáneo de glucosa y fructosa, lo cual tiene que ver con la capacidad fructofílica de la cepa de levadura empleada. Se confirmó que el tiempo de la fermentación alcohólica está alrededor de 160 horas, momento para el cual se han consumido todos los azúcares y se considera éste como punto final del proceso.

Se evidenció también que las células de levadura consumieron rápidamente el nitrógeno asimilable presente en el mosto en las primeras 90 horas de fermentación. Similar comportamiento se encontró durante la fermentación alcohólica de un medio sintético de glucosa y fructosa suplementado con sulfato de amonio, en la cual el nitrógeno fue agotado por las células de levadura en 5 días (Taillandier, Ramon Portugal, Fuster, & Strehaiano, 2007). El nitrógeno disponible en el inicio de la fermentación es utilizado por las células para incrementar su población, durante la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos

nucleicos, y otra parte es almacenado en las vacuolas como reservas celulares para la síntesis de nuevas proteínas durante la fase estacionaria de crecimiento (Hernandez-Orte, Bely, Cacho, & Ferreira, 2006; Taillandier et al., 2007).

Figura 3-14: Perfiles de consumo de sustratos (\* azúcares totales, ■ glucosa, ● fructosa, ○ nitrógeno asimilable) y producción de alcoholes (▲ etanol, ◆ glicerol) en la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C

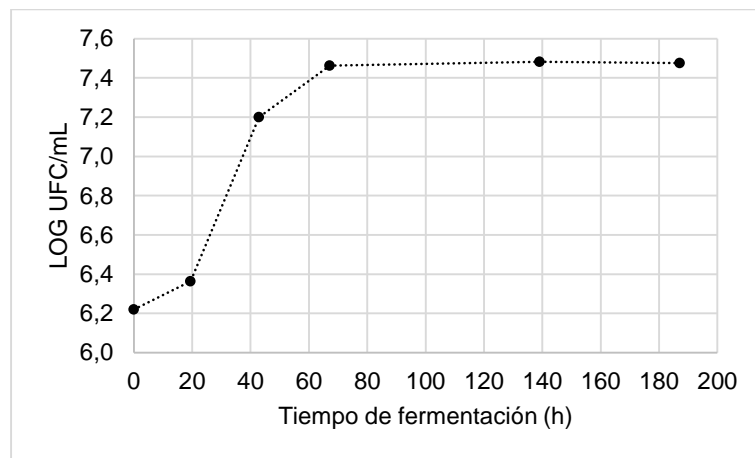


El consumo de nitrógeno asimilable (61 mg/L), encontrado en este estudio, representó el 51% del contenido inicial de NAL, más del doble del máximo encontrado en la fase anterior, sugiriendo una mejor asimilación de las células a las condiciones optimizadas del medio. Sin embargo, este valor es bajo en comparación con lo reportado por Mendes-Ferreira et al. (2010), donde el consumo de nitrógeno asimilable representó entre el 70-86% del contenido inicial. Esto indica nuevamente una suplementación excesiva y una concentración residual de estos compuestos, que incrementa el riesgo de contaminación del producto. Se ha reportado que la adición de polen apícola como fuente de NAL en la producción de hidromiel está relacionada con una menor producción de acidez volátil en comparación con la fermentación sin adición; sin embargo, a medida que la dosis de NAL incrementa la acidez volátil también lo hace (Roldán et al., 2011).

La generación de etanol y de glicerol ocurrió a medida que los azúcares fueron consumidos, mientras que no se observó una relación entre éstos y el consumo de NAL. Se observó que después de 160 horas el etanol y el glicerol alcanzaron su concentración máxima (Figura 3-14).

Respecto a las células de levadura, se encontró un crecimiento que sigue el comportamiento normal de reproducción de estos microorganismos. En las primeras 70 horas de fermentación se observó una alta velocidad de crecimiento, durante la cual se consumió la mayor parte de los sustratos y se produjo la mayor cantidad de etanol y glicerol, indicando un comportamiento asociado al crecimiento. Posteriormente, la concentración celular se mantuvo constante (fase estacionaria) hasta el final de la fermentación (aprox. 100 horas) (Figura 3-15). Durante esta etapa de crecimiento, también se observó una producción importante de etanol; igual comportamiento se ha reportado para la producción de hidromiel (Pereira et al., 2009).

Figura 3-15: Crecimiento celular de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica



Si bien la capacidad de adaptación y reproducción de la levadura está influenciada en gran medida por las condiciones propias del medio, el crecimiento obtenido es similar al reportado para procesos de producción de hidromiel (Pereira et al., 2013, 2014). El recuento máximo de células viables alcanzado en este estudio ( $2,98 \pm 0,07 E7$  UFC/mL) fue similar a lo reportado por Mendes-Ferreira et al., (2010) para fermentaciones de mostos de miel a 22°Brix y con concentraciones de NAL entre 35 y 259 mg/L. Estos resultados pueden compararse a pesar de que el conteo celular inicial no fue el mismo ( $10^5$  vs.  $10^6$ ), teniendo

en cuenta lo reportado por Pereira et al., (2013) en el que la fermentación alcohólica de mostos de miel a diferentes concentraciones celulares mostraron diferencias mínimas en la cinética de crecimiento y no se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados.

En la Tabla 3-5 se resumen las condiciones finales del hidromiel obtenido, los rendimientos y la productividad calculados y los requisitos fisicoquímicos de calidad establecidos por la normatividad colombiana (NTC 708, 2000). Los resultados muestran que el hidromiel elaborado cumple con los límites recomendados para el grado alcohólico, la acidez volátil y el pH.

Se observa que los valores predichos por los modelos de regresión obtenidos estadísticamente presentaron errores muy altos respecto a los datos experimentales. Sólo los modelos para el contenido de etanol y el rendimiento de la fermentación alcohólica presentaron estimaciones aceptables con errores inferiores al 10%, por tanto se recomienda utilizar estos modelos de regresión como herramientas para predecir el contenido de etanol probable en función del contenido inicial de azúcares y de nitrógeno asimilable en el mosto para la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C.

El rendimiento etanol/azúcares fue alto y similar al valor estequiométrico ( $Y_{e/a}^{est} = 0,511$ ). Esto sugiere una alta eficiencia en la transformación de los azúcares (glucosa y fructosa) en etanol, lo que se confirma con el alto grado alcohólico obtenido.

Tabla 3-5: Características fisicoquímicas del hidromiel elaborado y comparación con valores predichos y requisitos de calidad de la normatividad colombiana

Parámetro	Valores experimentales	Valores predichos	Error (%)	Requisitos <sup>1</sup>
pH	3,77 ± 0,02	-		2,8 – 4,0
NAL (mg/L)	59,5 ± 2,0	103,3	73,7	-
Etanol (%v/v)	15,1 ± 0,2	14,2	5,8	> 6
Glicerol (g/L)	6,6 ± 0,6	10,1	53,4	-
Acidez volátil (g/L)	0,14 ± 0,01	-		< 1,2
Rendimiento (g/g)	0,507 ± 0,005	0,461	9,1	-
Productividad (g/L-h)	0,73 ± 0,01	-		-

<sup>1</sup>(NTC 708, 2000)

Los valores para el contenido de etanol ( $15,1 \pm 0,2\%$  v/v) y rendimiento de la fermentación alcohólica ( $0,507 \pm 0,005$  g/g) fueron muy similares a los obtenidos en la primera fase de experimentación para el tratamiento T01 ( $15,8 \pm 0,8\%$ v/v y  $0,518 \pm 0,026$ g/g) que fue realizado bajo una condición de concentración de nitrógeno asimilable parecida. Esto muestra una consistencia de la dinámica de la fermentación alcohólica, al menos para estos parámetros. Por el contrario, el contenido de glicerol ( $6,6 \pm 0,6$  g/L) fue menor que los valores obtenidos en todos los ensayos de la primera fase de experimentación, lo cual junto con el mayor consumo de nitrógeno asimilable, indica una menor exposición de las levaduras a condiciones de estrés. Sin embargo, este valor está de acuerdo con lo encontrado en la literatura para la fermentación alcohólica de miel bajo condiciones experimentales similares: 5,4 – 6,6 g/L (Gomes et al., 2010, 2013; Pereira et al., 2014).

En comparación con el ensayo T01 ( $12,2 \pm 0,4$  g/L), el contenido de glicerol obtenido fue 46% menor; aunque se encuentra dentro del rango usual reportado para vinos (máx. 15 g/L) (Scanes et al., 1998). El glicerol juega un papel importante a nivel sensorial pues se le ha relacionado con la viscosidad, suavidad cuerpo y percepción del dulzor del vino en concentraciones superiores a 5 g/L, así como con la supresión en la percepción de la acidez, amargor y astringencia (Jackson, 2009).

La acidez volátil, conformada principalmente por ácido acético y fórmico, es un parámetro de calidad muy importante para los vinos pues está asociada con contaminación por bacterias acéticas y se considera un defecto sensorial, por tanto debe mantenerse en niveles bajos de concentración. El ácido acético puede reaccionar con el etanol para producir acetato de etilo, el éster más importante encontrado en los vinos, que en bajas concentraciones adiciona complejidad al vino, pero que cuando supera los 0,15 g/L genera olores desagradables a acetona (Jackson, 2009).

El hidromiel obtenido en esta fase presentó una acidez volátil muy baja ( $0,14 \pm 0,01$  g/L), menor a la reportada por diversos estudios e condiciones experimentales similares: 0,44 g/L (Sroka & Tuszyński, 2007), 0,51-0,84 g/L (Mendes-Ferreira et al., 2010), 0,56 g/L (Gomes et al., 2010) y 0,54 g/L (Gomes et al., 2013). Este mismo valor se encontró por debajo del umbral de olor para la detección del ácido acético en vinos -0,2 g/L (Jackson, 2009) por lo que no se encontró este defecto durante la evaluación sensorial.

Finalmente, la productividad de la fermentación alcohólica estuvo íntimamente relacionada con la dinámica acelerada y el alto rendimiento mostrados por la misma. El valor obtenido supera los reportados por estudios experimentales realizados previamente dentro del grupo de investigación: 0,41 g/L-h (Dávila, Blanco, & Quicazán, 2014), 0,27 g/L-h (Blanco et al., 2012), 0,34 g/L-h (Hernández, Blanco, Cuenca, et al., 2014) y por estudios similares a nivel internacional: 0,15 g/L-h (Gomes et al., 2010), 0,28-0,34 g/L-h (Mendes-Ferreira et al., 2010), 0,49 g/L-h (Pereira, Mendes-Ferreira, Oliveira, Estevinho, & Mendes-Faia, 2015). Un estudio realizado por Pereira et al. (2014) mostró una fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C a partir de un mosto a 23°Brix y 267 mg/L de nitrógeno asimilable, con una concentración inicial de células de levadura de 10<sup>6</sup> UFC/mL, para la cual la productividad reportada (0,74 g/L-h) fue similar a la obtenida en el presente estudio.

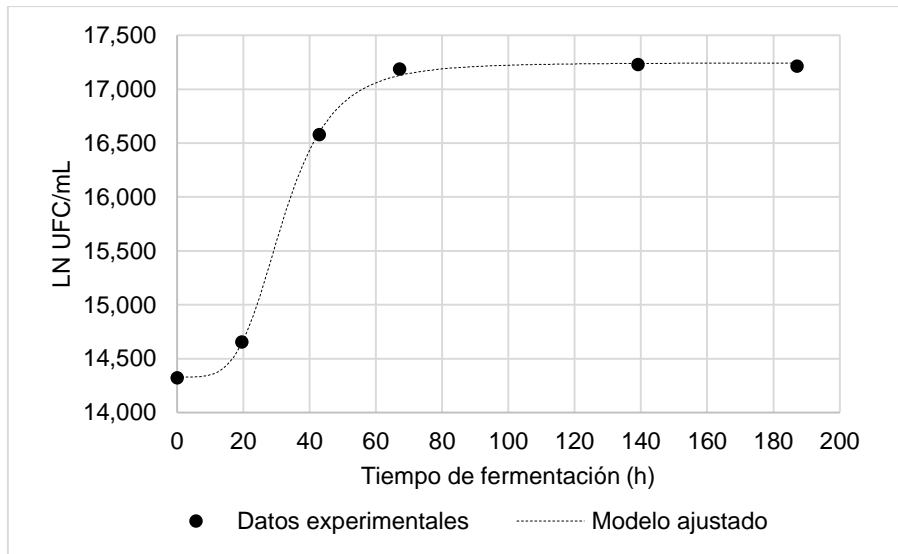
### Modelamiento cinético de la fermentación alcohólica

El modelamiento de la cinética de crecimiento celular mostrada en la Figura 3-15, se realizó mediante la variación de 4 parámetros (4P) del modelo logístico. Se llevó a cabo la correlación del logaritmo natural de la concentración de células viables de levadura ( $LN \text{ UFC/mL}$ ) en función del tiempo de fermentación a partir de los resultados experimentales (Ecuación 3.6).

$$LN \frac{UFC}{mL} = - \frac{2,915}{1 + \left(\frac{t}{32,016}\right)^{4,283}} + 17,245 \quad (Ec. 3.6)$$

Se logró obtener un modelo con un alto grado de ajuste de los resultados experimentales de crecimiento celular, prediciendo las fases *lag*, exponencial y estacionaria del microorganismo (Figura 3-16).

Figura 3-16: Modelo ajustado para los resultados experimentales del crecimiento celular (UFC/mL) en función del tiempo de fermentación.



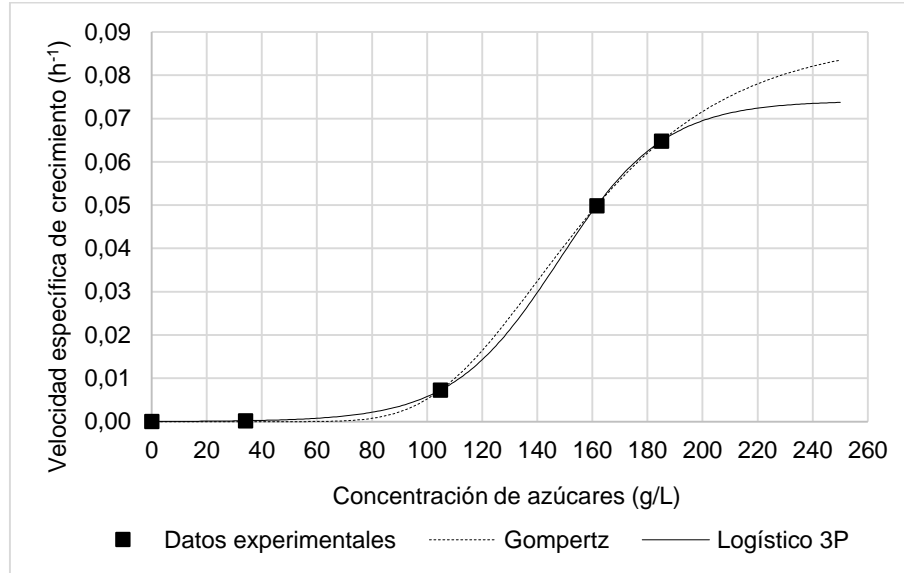
Posteriormente, se derivó el modelo anterior para obtener una expresión de la velocidad específica de crecimiento en función del tiempo,  $\mu = d\left(\text{LN} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}\right) / dt = f(t)$ , a partir de la cual se estimó esta variable para los tiempos de muestreo experimentales. Luego, se graficó el comportamiento de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu, h^{-1}$ ) en función de la concentración de azúcares totales en el mosto de fermentación ( $S, g/L$ ), al cual se le ajustaron los modelos logístico de 3 parámetros (3P) (Ecuación 3.7) y de Gompertz (Ecuación 3.8).

$$\mu = \frac{0,0741}{1 + e^{-0,0518*(S-147,6)}} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

$$\mu = 0,0885e^{-e^{-0,0259*(S-140,1)}} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Los modelos evaluados mostraron un alto grado de ajuste de los datos experimentales (Figura 3-17). Sin embargo, en valores alrededor de la concentración inicial de azúcares del mosto fermentativo (235,3 g/L) los modelos ajustados presentaron diferencias notorias. El modelo logístico 3P predice un comportamiento más acertado en esta zona, según el cual la velocidad de crecimiento de la levadura es casi constante cuando la concentración de azúcares es alta (Villadsen et al., 2011). A pesar de ello, para la mayor parte de la fermentación alcohólica, ambos modelos mostraron un ajuste adecuado.

Figura 3-17: Ajuste cinético de la velocidad específica de crecimiento celular en función del tiempo para la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C utilizando *Saccharomyces cerevisiae*



Se observó una incapacidad de la levadura para mantener una alta velocidad de crecimiento a lo largo de la fermentación alcohólica, fenómeno que puede estar asociado a condiciones de estrés debido a condiciones del medio. De los dos modelos ajustados se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento máximas de  $0,0885 h^{-1}$  y  $0,0741 h^{-1}$ . Considerando lo discutido anteriormente, se tomó el valor de  $0,0741 h^{-1}$  como el más apropiado para la velocidad máxima de crecimiento de la levadura durante la fermentación alcohólica de miel de abejas a 25°C, utilizando polen apícola como fuente de nitrógeno asimilable en un nivel de 120 mg/L y 235 g/L de azúcares (glucosa y fructosa). Este valor es cercano a los reportados en la literatura para procesos de producción de hidromiel:  $0,045 h^{-1}$  (Gomes et al., 2010),  $0,16 - 0,18 h^{-1}$  (Pereira et al., 2009),  $0,19 - 0,21 h^{-1}$  (Mendes-Ferreira et al., 2004).

Se realizó un análisis estadístico sobre la significancia de estos modelos y los estimadores de los parámetros, según el cual los tres modelos ajustados para las cinéticas de la levadura (logístico de 3P y 4P y de Gompertz) fueron significativos, así como los parámetros estimados. Además, los coeficientes de determinación ajustados ( $R_{ajustado}^2$ ) para cada modelo estuvieron por encima de 0,999 y las sumas de los residuales cuadrados fueron del orden de  $10^{-10}$  para los modelos de Gompertz y logístico de 3 parámetros y de

0,0049 para el modelo logístico de 4 parámetros, indicando una baja discrepancia entre los valores predichos por los modelos y los experimentales. Las tablas de ANOVA y de significancia sobre los parámetros de los modelos se encuentran en el Anexo I.

También se llevó a cabo el modelamiento de las cinéticas de consumo de glucosa ( $Glu, g/L$ ) y de fructosa ( $Fru, g/L$ ) mediante el modelo logístico 3P ( $R_{aj,glu}^2 = 0,9994, R_{aj,fru}^2 = 0,9986$ ) (Figura 3-18), de consumo de nitrógeno asimilable por la levadura ( $NAL, mg/L$ ) (Figura 3-19) y de producción de etanol ( $Eta, \%v/v$ ) por el modelo logístico de 4P ( $R_{aj,nal}^2 = 1,0000, R_{aj,eta}^2 = 0,9904$ ) (Figura 3-20) y de producción de glicerol ( $Gli, g/L$ ) por el modelo de Gompertz ( $R_{aj,glu}^2 = 1,000$ ) (Figura 3-21).

Figura 3-18: Cinéticas experimentales y modelos ajustados para el consumo de glucosa y fructosa durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio

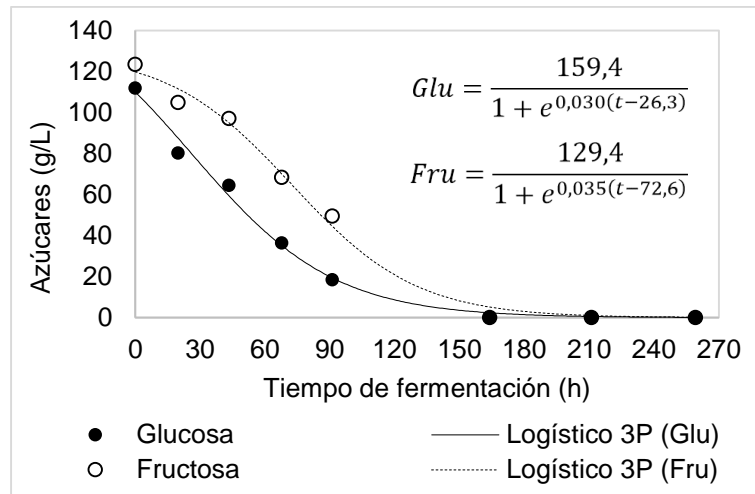


Figura 3-19: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para el consumo de nitrógeno asimilable durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio

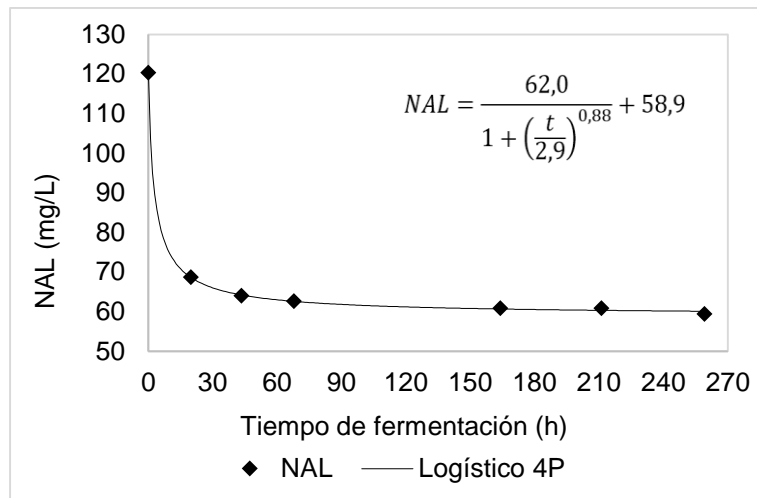


Figura 3-20: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de etanol durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio

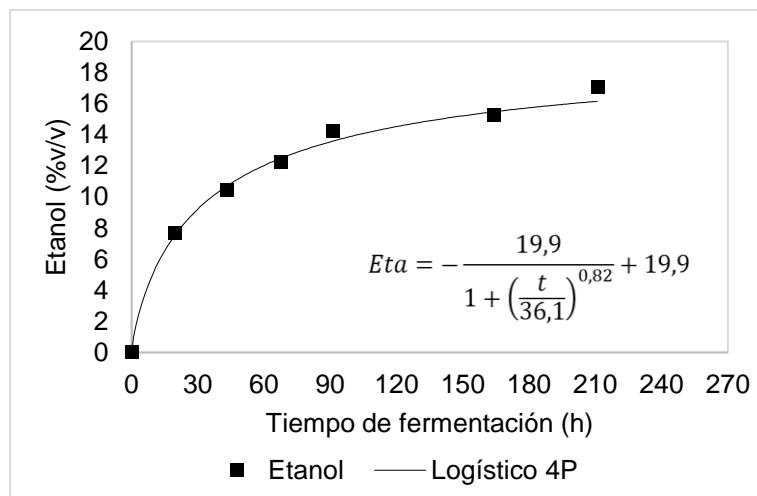
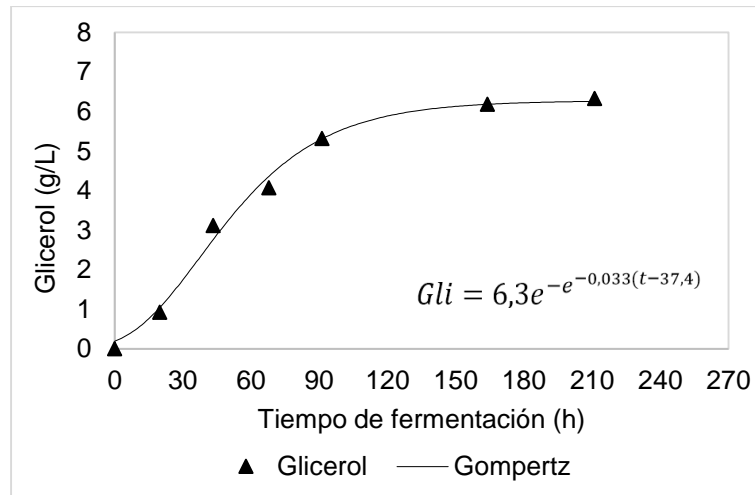


Figura 3-21 Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de glicerol durante la fermentación alcohólica de miel a escala de laboratorio



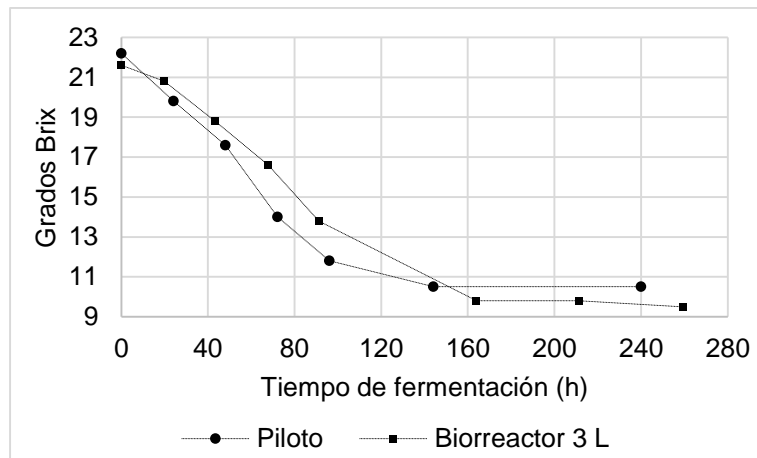
### 3.4 Fermentación a escala piloto

En esta fase se realizó el monitoreo de la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala piloto bajo las condiciones óptimas de concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa) y de nitrógeno asimilable encontradas. A lo largo del proceso se midieron el pH, los grados Brix, el consumo de sustratos (glucosa, fructosa, nitrógeno asimilable) y la producción de alcoholes (etanol y glicerol), así como la determinación de la acidez volátil del hidromiel obtenido. Los datos recopilados y los resultados completos se incluyen en el Anexo H.

#### Monitoreo de la fermentación alcohólica y caracterización del hidromiel

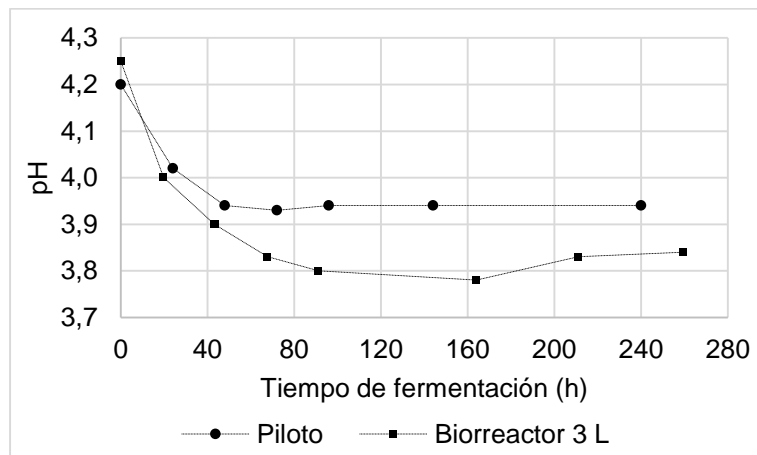
En esta fase se monitoreó la variación de los grados Brix, el pH y la concentración de azúcares (glucosa y fructosa), nitrógeno asimilable, etanol y glicerol presentes en el mosto. En comparación con los ensayos de fermentación alcohólica de miel realizados a escala de laboratorio, los grados Brix del mosto a escala piloto se estabilizaron en 10,5°Brix (1,3°Brix más alto) alrededor de las 140 horas y no se apreciaron diferencias marcadas en los perfiles de variación (Figura 3-22).

Figura 3-22: Comparación de los grados Brix durante la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala piloto y de laboratorio



En cuanto al pH, éste disminuyó más rápidamente hasta alcanzar un valor de 3,94 (0,11 unidad de pH más alto en comparación con la fermentación en el biorreactor) en las primeras 50 horas de fermentación, aproximadamente en la mitad del tiempo requerido en los ensayos a escala de laboratorio, indicando una cinética más acelerada (Figura 3-23).

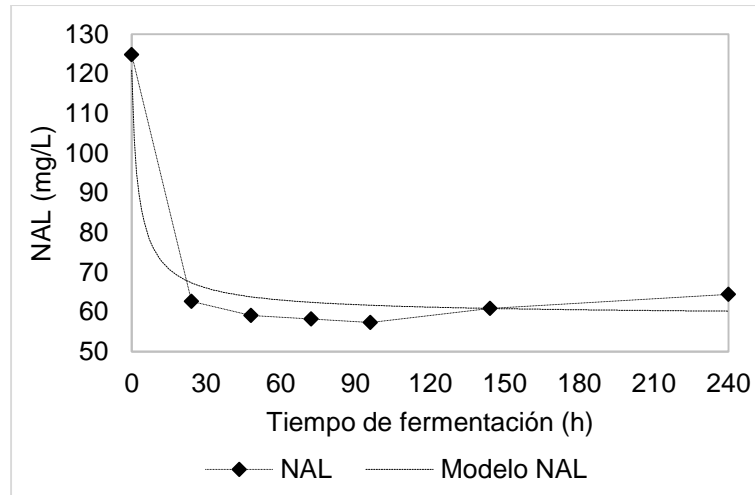
Figura 3-23: Comparación del índice de pH durante la fermentación alcohólica de miel de abejas a escala piloto y de laboratorio



Debido a que los modelos cinéticos obtenidos en la fase anterior presentaron altos grados de correlación, se emplearon para analizar los resultados de la fermentación a escala piloto. En este sentido, se encontraron diferencias considerables entre los perfiles cinéticos entre uno y otro ensayo.

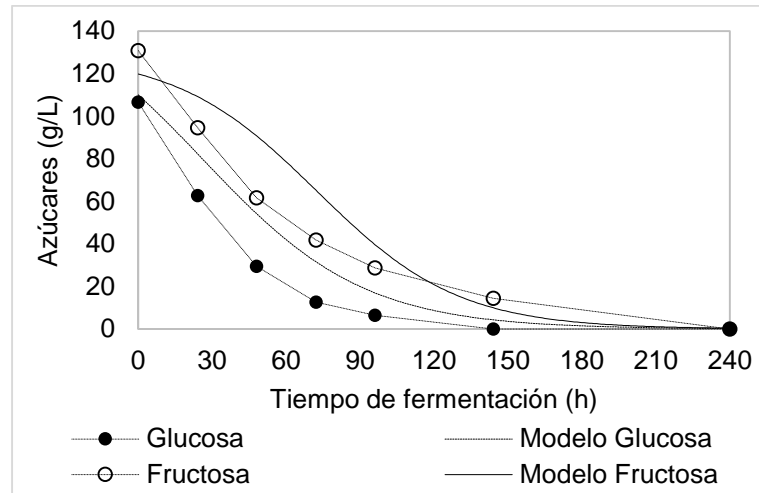
La cinética de consumo de nitrógeno asimilable (Figura 3-24) mostró una tendencia similar a la obtenida en escala de laboratorio. Estos compuestos fueron consumidos rápidamente por la levadura en las primeras 24 horas hasta alcanzar una concentración alrededor de 60 mg/L que se mantuvo hasta el final de la fermentación, confirmando una suplementación excesiva de nitrógeno de 50% aproximadamente. Se encontró que el modelo cinético para NAL se ajusta de manera satisfactoria a los resultados de la fermentación a escala piloto, pues el análisis sobre las diferencias entre los valores predichos por los modelos y los resultados experimentales arrojó un valor de la raíz del error cuadrático medio RMSE de 4,2 mg/L y un error de estimación promedio de 6,2%.

Figura 3-24: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para el consumo de nitrógeno asimilable



La fermentación a escala piloto presentó un consumo más acelerado de los azúcares, que se hizo más lenta hacia el final del monitoreo (Figura 3-25). La glucosa fue consumida totalmente en aproximadamente 20 horas menos que en los ensayos a escala de 3 L, mientras que la fructosa por el contrario tardó más en consumirse, mostrando una menor asimilación de este carbohidrato por parte de la levadura.

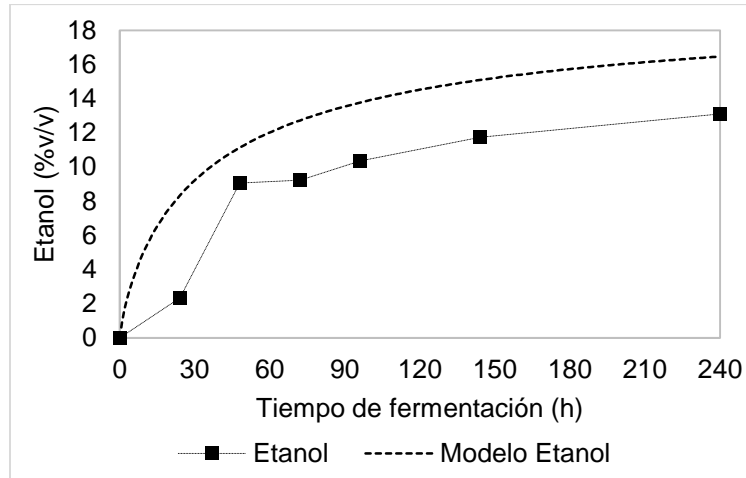
Figura 3-25: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para el consumo de glucosa y fructosa



Los valores de RMSE para las cinéticas de consumo de glucosa y de fructosa fueron 14,7 g/L y 16,4 g/L, a partir de los cuales se obtuvieron errores de estimación promedio del modelo de 37,3% y 44,5%, respectivamente. Cabe mencionar que los errores de las estimaciones para las concentraciones iniciales de glucosa y fructosa fueron aceptables (3% y 8%, respectivamente) por lo que se infiere que las grandes diferencias encontradas responden a modificaciones en la actividad de la levadura y no a la bondad del ajuste de los modelos.

A pesar de la alta velocidad de consumo de azúcares, la fermentación exhibió un arranque más lento en la producción de etanol en las primeras 24 horas de fermentación en comparación con el proceso en laboratorio (Figura 3-26), en donde la concentración llegó a ser más de 250% menos respecto a los valores predichos. El RMSE en este caso fue de 3,5%v/v, que correspondió a una sobrestimación promedio del modelo de 34% y de 27% respecto al valor final del contenido de etanol del hidromiel.

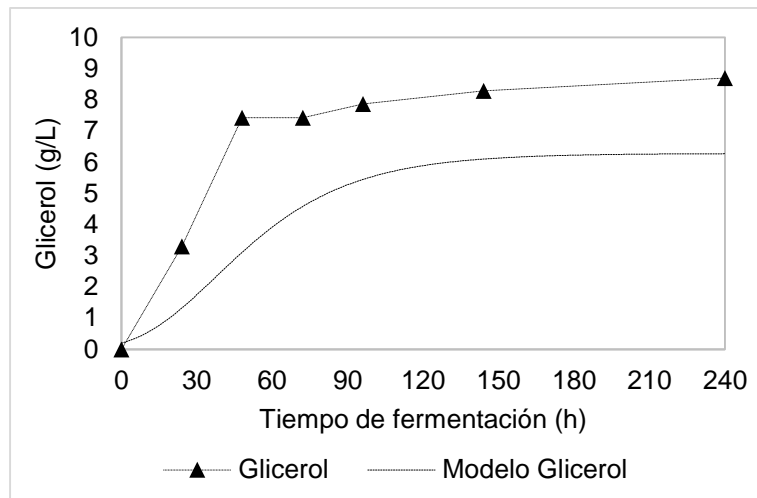
Figura 3-26: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para la producción de etanol



Similar a lo ocurrido en el bioreactor, la mayor cantidad de etanol se produjo en las primeras 90 horas de fermentación, cuando las células de levadura presentaron un crecimiento acelerado (fase exponencial). Durante este período, la fermentación mostró una recuperación en la producción de etanol, aunque su concentración no fue mayor en ningún momento a lo largo de proceso. Estos menores contenidos de etanol, estuvieron relacionados con un aumento en la producción de glicerol (Figura 3-27).

Para el caso del glicerol, el modelo ajustado también mostró grandes desviaciones en la predicción de la fermentación, que alcanzó niveles más altos a escala piloto durante todo el proceso. A diferencia de la cinética de producción de etanol, el contenido de glicerol aumentó rápidamente durante las primeras 48 horas de fermentación alcanzando valores hasta 60% más altos en comparación con los estimados. Posteriormente, la tasa de producción disminuyó y esta diferencia se mantuvo alrededor de 30%. El RMSE calculado fue de 2,6 g/L, que correspondió a una subestimación promedio de 40% y de 30% respecto al contenido final de glicerol del hidromiel.

Figura 3-27: Comparación de la cinética experimental obtenida a partir de datos a escala piloto y el modelo ajustado a escala de laboratorio para la producción de glicerol



La caracterización fisicoquímica del hidromiel elaborado a escala piloto (Tabla 3-6) mostró unas características finales que satisfacen los requisitos de calidad establecidos por la normatividad colombiana y que se encuentran dentro los rangos normales reportados para este producto. En comparación con los hidromieles obtenidos a escala de laboratorios, se observaron diferencias considerables excepto para el pH y el contenido de nitrógeno asimilable residual.

Tabla 3-6: Caracterización fisicoquímica del hidromiel elaborado a escala piloto

Parámetro	Valor
pH	3,94
NAL (mg/L)	62,7
Etanol (%v/v)	12,4
Glicerol (g/L)	8,5
Acidez volátil (g/L)	0,27
Rendimiento (g/g)	0,413
Productividad (g/L-h)	0,51

Se encontró un menor contenido de etanol y por tanto peores indicadores cinéticos (rendimiento etanol/azúcares y productividad), a diferencia del contenido de glicerol y de acidez volátil que fueron más altos en comparación con la fermentación en laboratorio. A pesar del incremento en la acidez volátil, este valor se encuentra cerca del límite máximo

normal encontrado en vinos (<0,3 g/L), lo cual le proporciona complejidad sensorial al hidromiel (Jackson, 2008).

Las diferencias encontradas en la cinética de las fermentaciones a escala de laboratorio y piloto pueden estar relacionadas con variaciones en el comportamiento de la levadura debido a la dificultad para promover una adecuada agitación durante la toma de muestras y la sedimentación celular (Gomes et al., 2010). La variación de la temperatura ambiental (18-30°C), en el lugar donde se realizó la fermentación a escala piloto fue otro factor determinante en la obtención de estas diferencias. Se ha reportado que la producción de glicerol, el consumo de glucosa y fructosa y la velocidad específica de crecimiento en la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* incrementa a medida que aumenta la temperatura, con un óptimo que se encuentra alrededor de 30°C (Balli et al., 2003; D'Amato, Corbo, Del Nobile, & Sinigaglia, 2006; Phisalaphong, Srirattana, & Tanthapanichakoon, 2006; Tronchoni, Gamero, Arroyo-López, Barrio, & Querol, 2009; Yalcin & Ozbas, 2008), mientras que la producción de etanol y el rendimiento etanol/azúcares disminuyen (Balli et al., 2003; Sener, Canbas, & Unal, 2007); además, al alcanzar temperaturas más altas durante el día en el ensayo a escala piloto, se favoreció la pérdida de etanol por evaporación reflejándose en un menor grado alcohólico al final del proceso. Gomes et al. (2013) reportaron también que durante la producción de hidromiel, el contenido de glicerol incrementa ligeramente a medida que aumenta la temperatura. Los resultados encontrados en esta investigación están soportados por lo descrito en los estudios mencionados anteriormente.

### **Modelamiento cinético de la fermentación**

Debido a la falta de ajuste de los modelos cinéticos obtenidos a partir de los resultados experimentales de la fermentación en el bioreactor sobre los perfiles de consumo de glucosa y fructosa y de producción de alcoholes obtenidos a escala piloto, se realizó un modelamiento de los datos de este último ensayo. Se ajustaron modelos logísticos 3P para el consumo de glucosa y fructosa ( $R_{aj,glu}^2 = 0,9999, R_{aj,fru}^2 = 0,9997$ ) (Figura 3-28) y logísticos 4P para la producción de etanol (Figura 3-29) y de glicerol (Figura 3-30) ( $R_{aj,eta}^2 = 0,9416, R_{aj,gli}^2 = 0,9807$ ).

Figura 3-28: Cinéticas experimentales y modelos ajustados para el consumo de glucosa y fructosa durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto

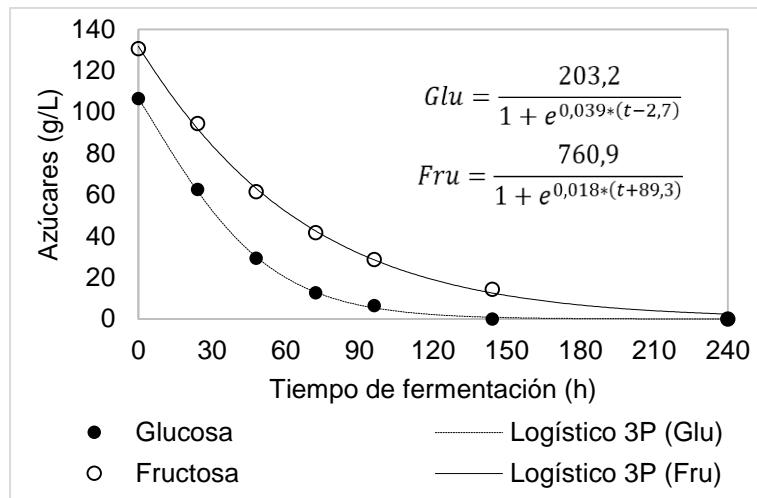


Figura 3-29: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de etanol durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto

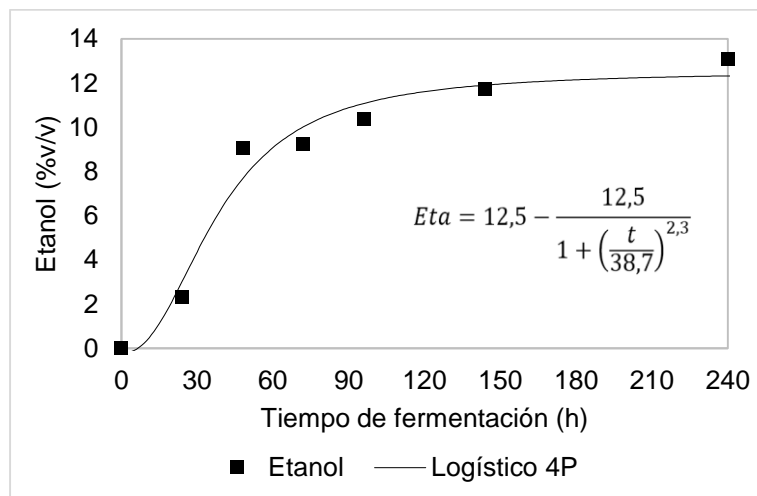
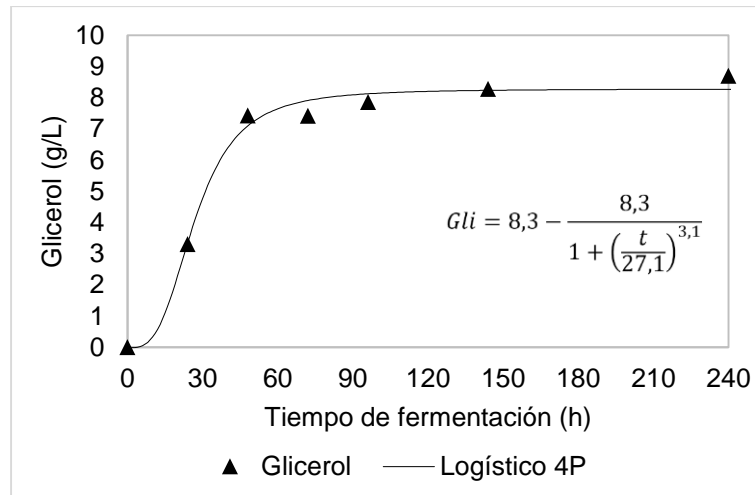


Figura 3-30: Cinéticas experimentales y modelo ajustado para la producción de glicerol durante la fermentación alcohólica de miel a escala piloto



### Evaluación sensorial de los hidromieles

El análisis sensorial realizado por un panel de jueces entrenados sobre los hidromieles obtenidos a escala de laboratorio y piloto mostró que el hidromiel realizado en el laboratorio presentó una tonalidad de amarillo más oscura (Figura 3-31) y una menor intensidad del color (Figura 3-32) que el elaborado en la planta piloto. Esta diferencia en el tono puede estar asociada a las variaciones encontradas en las características fisicoquímicas de los hidromieles. Según Jackson (2008) el cambio en color de los vinos blancos ocurre como producto de reacciones de pardeamiento fenólico. Este oscurecimiento también puede involucrar modificaciones estructurales de pigmentos o del ácido galacturónico inducido por iones metálicos, oxidación lenta y polimerización de compuestos fenólicos, condensación de productos de las reacciones de Maillard y caramelización de azúcares residuales en el vino. Teniendo en cuenta lo anterior, el tono más oscuro en el hidromiel obtenido en el laboratorio podría haber sido ocasionado por reacciones de Maillard entre otros azúcares reductores, distintos a la glucosa y fructosa, y aminoácidos residuales durante la etapa de pasteurización del hidromiel o por la oxidación de los pigmentos aportados por el polen apícola al hidromiel, principalmente carotenoides y flavonoides, debido a una mala práctica en el manejo del producto embotellado.

Figura 3-31: Comparación del tono de los hidromieles

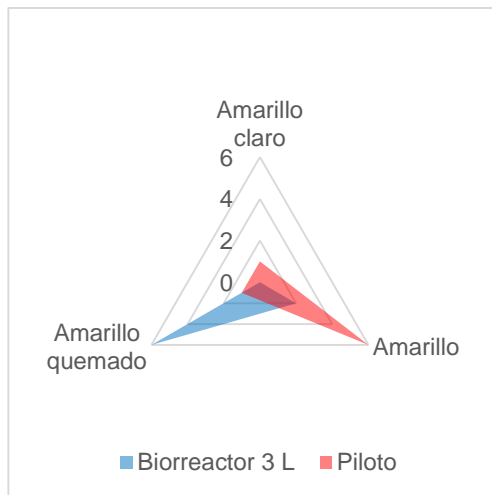
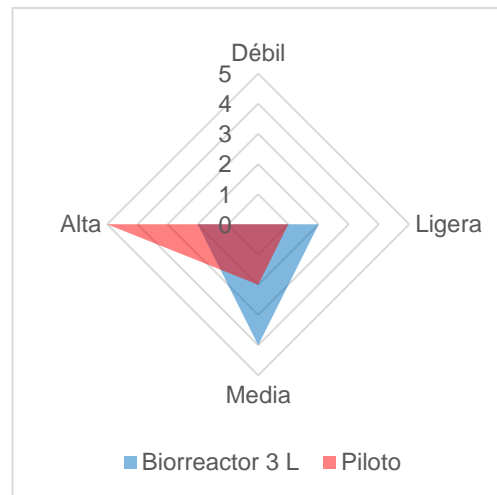
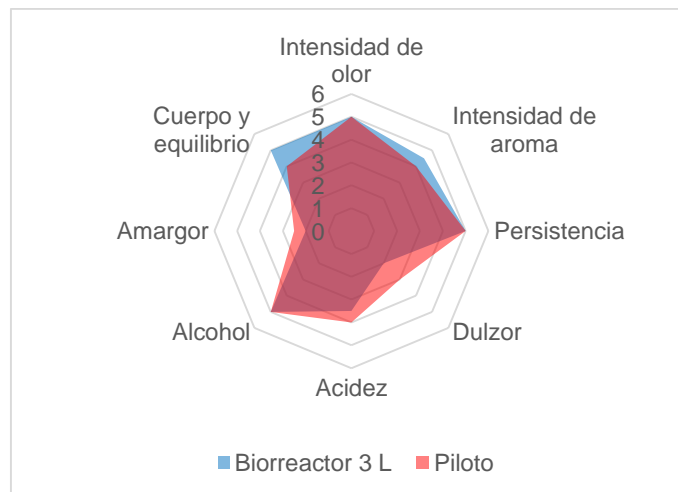


Figura 3-32: Comparación de la intensidad de color de los hidromieles



Los niveles de los diagramas radiales representan la frecuencia de las respuestas dadas por los panelistas para cada atributo organoléptico.

Figura 3-33: Comparación de atributos olfativos y gustativos de los hidromieles obtenidos a escala de laboratorio y piloto



Los hidromieles no presentaron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis sobre las medianas de los resultados para los grados de calidad para la intensidad de olor (*valor p* = 0,6104) y de aroma (*valor p* = 0,6996), persistencia aromática global (*valor p* = 0,9568), dulzor (*valor p* = 0,0529), acidez (*valor p* = 0,3179),

alcohol (*valor p* = 0,9121) y amargor (*valor p* = 0,8706), pero sí para el cuerpo y equilibrio (*valor p* = 0,0420) de los hidromieles (Figura 3-33).

El hidromiel realizado en laboratorio presentó un grado de calidad para el cuerpo y equilibrio significativamente mayor y, una menor intensidad en la percepción del dulzor, aunque esta diferencia no haya sido significativa. Ambos resultados están directamente relacionados con el grado alcohólico y el contenido de glicerol. Según Etaio et al. (2007) el dulzor del vino no está determinado por el contenido de azúcares residuales, sino al efecto conjunto del etanol y el glicerol, los cuales balancean o equilibran las sensaciones organolépticas de la acidez y el amargor del vino. El cuerpo, entendido como la viscosidad o el peso del vino, está relacionado directamente con el contenido de etanol y en menor medida con el de glicerol (Jackson, 2009), por tanto es probable que un vino con un grado alcohólico más alto tenga un mayor cuerpo. En este caso, el hidromiel obtenido a escala de laboratorio presentó un mayor contenido de etanol y un menor contenido de glicerol, lo que en términos sensoriales explica una percepción del dulzor ligeramente menor y un cuerpo y equilibrio mayor. Los resultados de atributos olfativos y gustativos también mostraron que la variación observada en el pH al final de la fermentación, no tuvo implicación en la percepción de la acidez de los hidromieles.

En general, ambos hidromieles presentaron un perfil de olor y aroma relacionado con descriptores propios de la miel de abejas, indicando una conservación de estos olores y aromas primarios en el producto. Sin embargo, el hidromiel obtenido en el laboratorio mostró una mayor complejidad (Figura 3-34), caracterizada principalmente por notas frutales (de fruta madura), caramelo y olores relacionados con la actividad apícola (cera, panal, colmena). Dicha complejidad está relacionada con la presencia de una mayor variedad de compuestos en el hidromiel como proteínas celulares, polisacáridos, ácidos orgánicos, ésteres, etc., que evidentemente también ejercieron influencia sobre la mayor percepción del cuerpo del hidromiel (Jackson, 2009). Por su parte, el hidromiel elaborado en la planta piloto también incluyó descriptores de olores y aromas principalmente frutales (fruta tropical y fruta fermentada) y algunas notas menores que recuerdan a la miel. Este perfil sensorial más pobre tiene que ver con las variaciones de temperatura experimentadas en el lugar donde se llevó a cabo la fermentación alcohólica, debido a que

mayores temperaturas durante el día (28-30°C) conllevaron a la pérdida de notas más sutiles que podrían enriquecer la complejidad de olores y aromas del hidromiel.

Figura 3-34 Comparación de la complejidad de olores y aromas de los hidromieles obtenidos a distintas escalas de producción

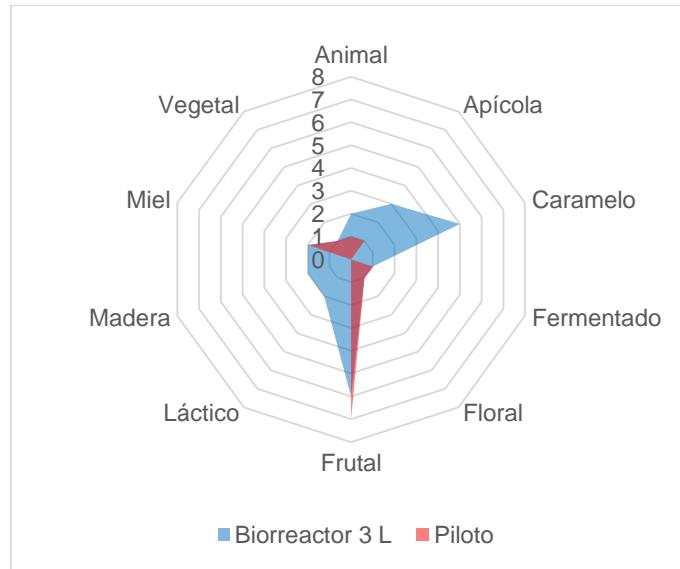
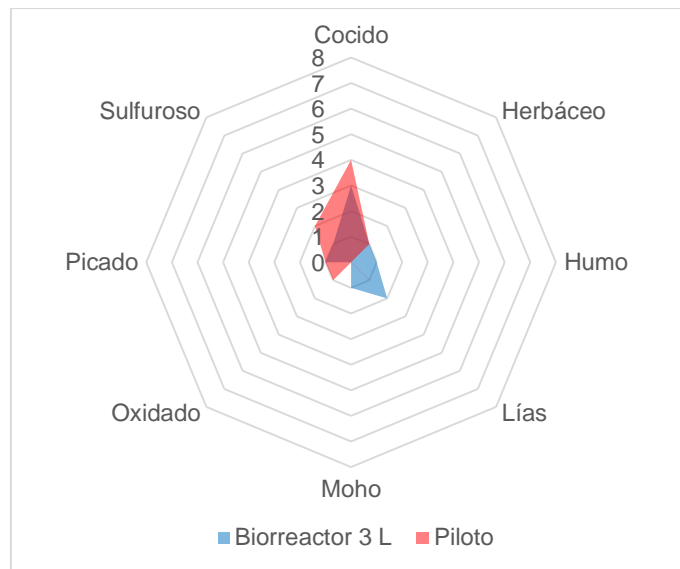


Figura 3-35: Comparación del perfil de defectos de olor y aroma de los hidromieles obtenidos a distintas escalas de producción



Respecto a los defectos sensoriales, en ambas escalas de producción, el defecto más importante fue la presencia de olores a cocido, seguido de lías y sulfuroso (Figura 3-35). El primero, es causado principalmente por la pasteurización del mosto de miel y del

hidromiel. El olor a lías hace referencia a los sedimentos de materia orgánica procedentes de la levadura que precipitan en el fondo del fermentador (Etaio et al., 2007), mientras que el sulfuroso se debe principalmente a la producción de dióxido de azufre por la levadura, caracterizado por un olor irritante similar al de una cerilla quemada (Jackson, 2009). Los demás defectos de olor y aroma no mostraron ser importantes en ambos hidromieles

Finalmente, se obtuvo la caracterización sensorial de los hidromieles elaborados a ambas escalas de producción (Tabla 3-7) a partir de la descripción visual y olfativa y los grados de calidad asignados por el panel sensorial a los hidromieles elaborados.

Tabla 3-7 Comparación de los perfiles sensoriales descriptivos de los hidromieles elaborados a diferentes escalas de producción

<b>Atributo sensorial</b>	<b>Hidromiel Laboratorio</b>	<b>Hidromiel Piloto</b>
Tono de color	Amarillo quemado	Amarillo
Intensidad de color	Media	Alta
Intensidad de olor	Alta	Alta
Intensidad de aroma	Alta	Media-Alta
Descripción de olor y aroma	Frutal (fruta madura), caramelo, cera, panal, colmena	Frutal (fruta tropical) y notas a miel
Persistencia aromática global	Alta	Alta
Intensidad de dulzor	Muy baja	Baja
Intensidad de acidez	Media-Baja	Media
Intensidad de alcohol	Alta	Alta
Intensidad de amargor	Muy baja	Baja-Muy baja
Cuerpo y equilibrio	Alta	Media

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

### **4.1 Conclusiones**

Las mayores concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) en el mosto fermentativo de miel de abejas (<32% p/p), permiten obtener hidromieles con grados alcohólicos y concentraciones de glicerol mayores, así como rendimientos de la fermentación alcohólica y consumo de nitrógeno asimilable más bajos y mayores contenidos de azúcares residuales totales. Además, no hay relación entre el contenido inicial de nitrógeno asimilable y la producción de etanol y glicerol, y el consumo de este sustrato es favorecido a niveles bajos de este sustrato.

Las mejores condiciones para la producción de hidromiel respecto a estas variables de respuesta son: una concentración de azúcares entre 22 y 24% p/p y de nitrógeno asimilable entre 65-130 mg/L. La adición de 50 g/L de polen (25,9% p/p de proteína y 2,56 mg/L de nitrógeno asimilable por la levadura) ejerció un efecto positivo sobre la cinética de fermentación alcohólica de mostos de miel de abejas a 22°Brix y 25°C, propiciando una disminución de entre 17-30% en el tiempo de fermentación (7-8 días) en comparación con estudios previos realizados dentro del grupo de investigación. Bajo estas condiciones optimizadas, se lograron obtener hidromieles, tanto a escala de laboratorio como piloto, con parámetros fisicoquímicos acordes a los requisitos establecidos por la normatividad colombiana para vinos de frutas.

El requerimiento de nitrógeno asimilable por la levadura utilizada en las fermentaciones a escala de laboratorio y ambiental es bajo (aproximadamente 60 mg/L), lo cual confirma lo reportado por el productor de la levadura empleada.

La pasteurización como método de higienización del mosto fermentativo de miel y de estabilización microbiológica del hidromiel parece estar relacionada con la aparición de

olor y aroma a cocido, identificado como el principal defecto sensorial en los productos desarrollados.

Los modelos logísticos y de Gompertz son alternativas para modelar satisfactoriamente el comportamiento cinético de la fermentación alcohólica de miel de abejas con fines de monitoreo y control de este proceso tanto en investigación en laboratorio como en producción a escala piloto y posiblemente a mayor escala.

Las variaciones de temperatura afectan de manera considerable las cinéticas de consumo de azúcares y de producción de etanol y glicerol de la fermentación alcohólica de miel de abejas realizada a condiciones controladas. Los modelos ajustados en el laboratorio no tienen utilidad como herramientas predictivas para el control y monitoreo de la fermentación alcohólica en la planta piloto, para ello se deben implementar los modelos cinéticos obtenidos a partir de los resultados experimentales en este último caso. El control de la temperatura es importante para la calidad sensorial de los hidromieles pues contribuye a la minimización de la pérdida de aromas de la miel de abejas, ejerciendo un efecto importante sobre la complejidad aromática y el cuerpo y equilibrio de los mismos.

La producción de hidromieles bajo las condiciones de operación utilizadas en este estudio (22% p/p de azúcares, 122 mg/L de nitrógeno asimilable, 25°C) permite obtener productos de alta calidad sensorial, con pocos defectos de olor y aroma y un perfil descriptivo atractivo.

## **4.2 Recomendaciones**

Se recomienda realizar la evaluación de concentraciones de nitrógeno asimilable por la levadura menores a 65 mg/L utilizando polen apícola en la fermentación alcohólica de miel de abejas utilizando sistemas controlados de fermentación, que permita determinar el efecto de la suplementación excesiva de nitrógeno sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de los hidromieles.

Implementar nuevas técnicas o tecnologías o validar nuevas condiciones de temperatura y tiempo durante la pasteurización del mosto y el hidromiel como alternativas para la higienización y estabilización microbiológica de los mismos.

# A. Anexo: Ficha técnica de la levadura Uvaferm BC

**uvaferm BC<sup>®</sup>**  
*Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*

*Cepa de levadura ideal para condiciones difíciles*

## Aplicaciones

---

Uvaferm BC<sup>®</sup> fue seleccionada por el Instituto Pasteur, París, Francia. Esta cepa de levadura tiene propiedades de fermentación sobresalientes. Particularmente recomendada para afrontar condiciones difíciles, por ejemplo alto potencial alcohólico y en situación de carencia de frigorías para mantener fermentaciones con velocidad moderada de fermentación. Tiene bajos requerimientos de nitrógeno.

Es una cepa neutra desde el punto de vista aromático y respeta los aromas varietales.

Uvaferm BC<sup>®</sup> es apropiada para fermentación de mostos blancos y tintos en depósitos de gran volumen. Asimismo para la elaboración de vinos blancos con control de temperatura y para vinos espumosos, según método tradicional. Es una cepa ideal para resolver las paradas de fermentación y para fermentaciones difíciles.

Se indica además, en la fermentación de mostos concentrados reconstituidos.

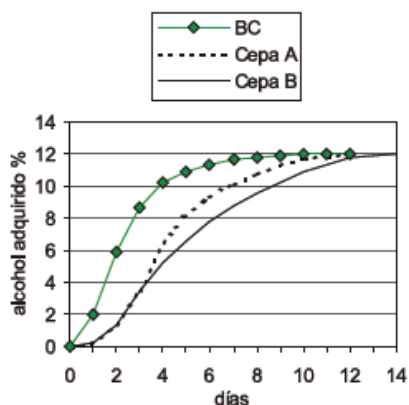
## Propiedades microbiológicas y enológicas

---

- Excelente comienzo de fermentación en presencia de altas concentraciones de azúcares y de alcohol aunque con un período de latencia generalmente muy largo.
- Buena capacidad de predominio sobre la población indígena.
- Criotolerante, fermenta a partir de 12°C.
- Poco exigente en nutrientes.
- Elevado rendimiento alcohólico
- Elevada resistencia al alcohol, incluso hasta 17% de alcohol en volumen.
- Baja producción de acidez volátil y de acetaldehído
- Producción media de glicerina.
- Baja producción de sulfhídrico.



## Seguridad fermentativa en comparación con otras cepas



## Dosis de utilización

Vinificación en blancos: 20-30 g/hl.

Dosis inferiores o el uso de pie de cuba puede producir dificultades en el predominio de la cepa sobre la flora indígena.

## Instrucciones de empleo

- Rehidratar la levadura en 10 veces su peso en agua a 37-40°C, agitando suavemente.
- Disolver cuidadosamente removiendo suavemente y esperar 20 minutos.
- Adicionar al mosto. La diferencia de temperatura entre el mosto a ser inoculado y el medio de rehidratación no debería ser superior a 10°C. (Cualquier duda, consultar al proveedor o a Lallemant).
- La duración de la rehidratación total no debería exceder los 45 minutos.
- Es esencial rehidratar la levadura en un contenedor limpio.
- Se desaconseja la rehidratación directa en mosto.

**uvaferm**<sup>®</sup>

Seleccionado y producido por:

**LALLEMAND**

Soluciones naturales para añadir valor a tus vinos

B.P. 59

31702 Blagnac CEDEX

Tél.: +33(0)5 62 74 55 55

Fax: +33(0)5 62 74 55 00

[www.lallemantwine.com](http://www.lallemantwine.com)

Distribuido por:



## B. Anexo: Medición del contenido de nitrógeno asimilable

La determinación del contenido de nitrógeno asimilable en la industria vinícola se realiza tradicionalmente mediante el método de Sorensen, el cual se basa en la titulación potenciométrica de aminoácidos con hidróxido de sodio en presencia de formaldehído. El formaldehído adicionado reacciona con los aminoácidos presentes en la muestra liberando hidrogeniones ( $H^+$ ) en proporción con la concentración de nitrógeno disponible. Como resultado de esta reacción el pH de la muestra disminuye y la cantidad de hidróxido de sodio requerida para neutralizar los iones  $H^+$  liberados permite estimar el contenido de nitrógeno proporcionado por los aminoácidos, así como por los iones amonio ( $NH_4^+$ ) presentes en la muestra.

### Reactivos

- Hidróxido de sodio 1 N
- Hidróxido de sodio 0,0862 N
- Formaldehído 35-37%
- Agua desionizada
- Fosfato di-hidrógeno de amonio (FDA)
- Soluciones buffer (pH7 y pH4)

### Equipos y materiales

- Balanza analítica calibrada
- Medidor de pH
- Agitador tipo vórtice
- Vasos de precipitados de 250 ml
- Balones aforados de 50 ml
- Tubos Falcon® de 50 ml
- Transfer pipeta de 10 ml
- Pipetas plásticas Pasteur
- Montaje de titulación

### Validación de la metodología

Como reactivo de referencia se utilizó fosfato di-hidrógeno de amonio (FDA) que contiene 12,2% de nitrógeno (1 g de FDA aporta 122 mg de N). Se prepararon distintas soluciones diluyendo 0,043, 0,067 y 0,087 g de FDA en 50 ml de agua desionizada en vasos de precipitados de 250 ml y se les ajustó el pH en un valor de 8,00 mediante adición de hidróxido de sodio 1 N. Se adicionaron 10 ml de una solución de formaldehído a la que se le ajustó previamente el pH en un valor de 8,00 con hidróxido de sodio 1N. Se agitaron las soluciones hasta la disolución completa del FDA y luego de un minuto se tituló cada muestra con hidróxido de sodio 0,0862 N hasta alcanzar un valor estable de pH alrededor

de 8,00. Se anotó el volumen gastado de hidróxido de sodio 0,0862 N en la titulación y se calculó la concentración de nitrógeno según la siguiente expresión:

$$N \left[ \frac{\text{mg N}}{\text{g FDA}} \right] = \frac{\text{vol. NaOH (ml)} * 0,0862 \frac{\text{mmol OH}^-}{\text{ml}} * \frac{1 \text{ mmol N}}{1 \text{ mmol OH}^-} * 14 \frac{\text{mg N}}{\text{mmol N}}}{\text{peso de FDA (g)}}$$

$$N \left[ \frac{\text{mg N}}{\text{g FDA}} \right] = 1,2068 \left( \frac{\text{mg N}}{\text{ml}} \right) * \frac{\text{vol. NaOH (ml)}}{\text{peso de FDA (g)}}$$

### Resultados de la validación del método Sorensen

En la Tabla B-1 se presentan los resultados de los ensayos experimentales para la validación del método de Sorensen utilizando soluciones de fosfato di-hidrógeno de amonio de concentraciones conocidas. El error reportado en la tabla se calculó con respecto al contenido estequiométrico de nitrógeno aportado por el fosfato di-hidrógeno de amonio (122 mg-N/g-FDA).

Tabla B-1: Resultados obtenidos mediante el método de Sorensen para distintas soluciones de fosfato di-hidrógeno de amonio (FDA)

Solución	Peso de FDA (g)	Volumen de NaOH gastado (ml)	Contenido de nitrógeno asimilable (mg-N/g-FDA)	Error (%)
A	0,0437	4,15	114,6	6,1
	0,0436	4,2	116,3	4,7
	0,0433	4,15	115,7	5,2
B	0,0666	6,4	116,0	4,9
	0,0660	6,4	117,0	4,1
	0,0669	6,5	117,3	3,9
C	0,0863	8,35	116,8	4,3
	0,0862	8,35	116,9	4,2
	0,0874	8,5	117,4	3,8

De la Tabla B-1 se obtiene que el error promedio de las mediciones es 4,6%, lo cual es un indicador de que la técnica funciona correctamente bajo las condiciones de trabajo empleadas, puesto que el valor obtenido se encuentra por debajo del error máximo aceptado normalmente durante ensayos de experimentación en laboratorio (5%).

En la Tabla B-2 se presentan los resultados del análisis de varianza de un factor realizado sobre los resultados obtenidos en la validación del método Sorensen, donde los grupos

corresponden a los resultados por triplicado obtenidos para cada una de las soluciones de FDA empleadas (A, B, C).

Tabla B-2: Análisis de varianza (ANOVA) sobre los resultados de la validación de la metodología Sorensen utilizando fosfato di-hidrógeno de amonio

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor p</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,872	2	1,936	4,592	0,062	5,143
Dentro de los grupos	2,530	6	0,422			
Total	6,402	8				

De la Tabla B-2 se puede afirmar que con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula dado que el *valor p* es mayor a la significancia. Se concluye entonces que no existen diferencias significativas entre los resultados del contenido de nitrógeno obtenidos para las distintas soluciones de fosfato di-hidrógeno de amonio. Esto es un indicador de la confiabilidad de la metodología descrita previamente.

### **Metodología para la medición de NAL en polen apícola**

Se pesaron 3 gramos de polen apícola seco en un tubo Falcon® y se adicionaron aproximadamente 40 ml de agua desionizada. El tubo se colocó en un mezclador tipo vórtice a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se transfirió cuantitativamente a un vaso de precipitados de 250 ml realizando varios lavados del tubo con agua desionizada. Se ajustó el pH de la muestra en un valor de 8,00 adicionando hidróxido de sodio 1 N y se adicionaron 10 ml de formaldehído al que se le ajustó previamente el pH en un valor de 8,00. Se agitó la muestra y después de un minuto se tituló con hidróxido de sodio 0,0862 N hasta alcanzar un valor estable de pH alrededor de 8,00. Se anotó el volumen gastado de hidróxido de sodio y se calculó el contenido de nitrógeno asimilable (NA) mediante la siguiente expresión:

$$NA \left( \frac{\text{mg N}}{\text{g polen}} \right) = \frac{\text{vol. NaOH (ml)} * 0,0862 \frac{\text{mmol OH}^-}{\text{ml}} * \frac{1 \text{ mmol N}}{1 \text{ mmol OH}^-} * 14 \frac{\text{mg N}}{\text{mmol N}}}{\text{peso muestra de polen (g)}}$$

$$NA \left( \frac{\text{mg N}}{\text{g polen}} \right) = 1,2068 \left( \frac{\text{mg N}}{\text{ml}} \right) * \frac{\text{vol. NaOH (ml)}}{\text{peso muestra de polen (g)}}$$

En la Tabla B-3 se presentan los resultados para el contenido de nitrógeno asimilable por la levadura (NAL) en el polen apícola empleado en las fermentaciones alcohólicas de miel de abejas. Las mediciones se realizaron por triplicado en dos días distintos por el mismo analista.

Tabla B-2: Contenido de NAL en polen apícola determinado por el método Sorensen

Réplica #1		Réplica #1	
Peso de polen (g)	3,0103	Peso de polen (g)	3,2266
Vol. NAOH (ml)	6,40	Vol. NAOH (ml)	6,65
<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,57</b>	<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,49</b>
Réplica #2		Réplica #2	
Peso de polen (g)	3,0118	Peso de polen (g)	3,4683
Vol. NAOH (ml)	6,25	Vol. NAOH (ml)	6,7
<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,50</b>	<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,33</b>
Réplica #3		Réplica #3	
Peso de polen (g)	3,0115	Peso de polen (g)	3,4435
Vol. NAOH (ml)	7,30	Vol. NAOH (ml)	7,35
<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,93</b>	<b>NAL (mg-N/g-polen)</b>	<b>2,58</b>

El análisis de varianza (ANOVA) de un factor realizado sobre los resultados de la Tabla B-4 muestra que con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula dado que el *valor p* es mayor a la significancia. Se concluye entonces que no existen diferencias significativas entre los resultados del contenido de nitrógeno asimilable del polen medidos.

Tabla B-4: Análisis de varianza (ANOVA) de un factor sobre el NAL del polen

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor crítico para F</b>
Entre grupos	0,011	1	0,011	0,236	0,652	7,709
Dentro de los grupos	0,183	4	0,046			
Total	0,19a	5				

## C. Preparación de muestras para análisis mediante HPLC

### Preparación de muestras de miel de abejas

Se pesaron aproximadamente 0,6 gramo de miel de abejas en un vaso de precipitados de 100 mL y se disolvió en aproximadamente 30-40 mL de agua desionizada, desgasificada, micro-filtrada y esterilizada (agua grado HPLC) mediante agitación. Esta solución se transfirió cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL clase A y se completó el volumen del balón aforado con agua HPLC. Se filtraron alrededor de 2 ml de esta solución de miel de abejas a través de un cartucho Sep-Pak C18 y de un filtro estéril hidrofílico SARTORIUS de 0,2  $\mu\text{m}$  MINISART. Se recolectó alrededor de 1 mL de la solución filtrada en viales estériles.

### Preparación de muestras de polen apícola

Se pesaron aproximadamente 5 gramos de polen apícola seco en un tubo Falcon® de 50 ml, al cual se adicionaron 40 ml de agua HPLC. Se colocó este tubo en un mezclador tipo vórtice a 1500 rpm durante 5 minutos y luego se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante en un balón aforado de 25 ml el cual se aforó con agua HPLC. De esta solución se filtraron alrededor de 5 ml a través de un cartucho Sep-pak C18 y de un filtro estéril hidrofílico SARTORIUS de 0,2  $\mu\text{m}$  MINISART. Se recolectó alrededor de 1 mL de la solución filtrada en viales estériles.

### Preparación de muestras de hidromiel

Se tomaron alícuotas de 1 mL de hidromiel y se llevaron a volumen en balones aforados de 25 mL con agua grado HPLC. Se agitaron las muestras manualmente y de esta dilución se filtró una parte a través de un cartucho estéril hidrofílico SARTORIUS de 0,2  $\mu\text{m}$  MINISART. Se recolectó alrededor de 1 mL de la solución filtrada en viales estériles.

## D. Anexo: Formatos para evaluación sensorial de miel, polen e hidromiel

### ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO A MIEL DE ABEJAS

Proyecto de tesis de Maestría en Ingeniería química

#### Evaluación visual

Estado físico		Apariencia	
Líquida	<input type="radio"/>	<i>Separación de fases</i>	<input type="radio"/> Homogénea <input type="radio"/> No homogénea
Líquida/cristalizada	<input type="radio"/>		<input type="radio"/> Limpia
Cristalizada	<input type="radio"/>	<i>Translucidez*</i>	<input type="radio"/> Turbia <input type="radio"/> No aplica
		<i>Materiales extraños</i>	<input type="radio"/> Ausencia <input type="radio"/> Presencia

\*Si el estado físico de la muestra es líquida/cristalizada o cristalizada seleccione **No aplica**.

#### Color: evalúe la intensidad y el tono

Muy claro	<input type="radio"/>	Casi sin color	<input type="radio"/>
Claro	<input type="radio"/>	Amarillo paja	<input type="radio"/>
Medio	<input type="radio"/>	Ámbar	<input type="radio"/>
Oscuro	<input type="radio"/>	Ámbar oscuro	<input type="radio"/>
Muy oscuro	<input type="radio"/>	Casi negra	<input type="radio"/>

#### Evaluación olfativa

##### Intensidad de olor

No perceptible  Débil  Mediano  Fuerte

#### Evaluación olfato – gustativa

##### Intensidad de sabores básicos

	Dulce	Ácido	Amargo	Salado
No perceptible	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Débil	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mediano	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fuerte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

##### Intensidad de aroma

No perceptible  Débil  Mediano  Fuerte

#### Descripción de olor y aroma

---

#### Evaluación de defectos

Defecto		Intensidad	
Fermentado:	Nula	—————→	Alta
Humo:	Nula	—————→	Alta
Metálico:	Nula	—————→	Alta
Humedad:	Nula	—————→	Alta

#### Comentarios e impresiones generales

---



---

**ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO A POLEN APÍCOLA SECO**  
Proyecto de tesis de Maestría en Ingeniería química

**Evaluación visual.**

**Color.** Seleccione una de las opciones. En caso de considerar la muestra monocolor describa el color predominante de la muestra.

Monocolor  Color predominante: \_\_\_\_\_  
Multicolor

**Forma:** Redondo   
Acorazonado   
Irregular (amorfo)

**Impurezas macroscópicas:** Ausencia   
Presencia

**Evaluación olfativa**

**Intensidad de olor:** Débil   
Media   
Intensa / fuerte

**Descripción del olor:**

---



---

**Evaluación olfato – gustativa**

**Sensación en boca.** Seleccione la sensación gustativa generada al degustar la muestra

	DULCE	ÁCIDO	AMARGO
No perceptible	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Débil	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mediano	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fuerte	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**Evaluación de defectos.**

Defecto	Intensidad
Humedad	Nula _____ Alta
Rancidez	Nula _____ Alta
Amargo	Nula _____ Alta
Fermentación	Nula _____ Alta

*Comentarios e impresiones generales*

---



---

### ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO A HIDROMIELES

Proyecto de tesis de maestría en Ingeniería química

#### 1. Evaluación visual

**Limpidez:** Seleccionar una o varias opciones

Turbio   
Limpio

**Matiz o tono:** Seleccionar una opción

Amarillo claro	<input type="radio"/>	Café	<input type="radio"/>
Amarillo	<input type="radio"/>	Ámbar	<input type="radio"/>
Amarillo quemado	<input type="radio"/>	Otro:	<input type="radio"/>
Ocre	<input type="radio"/>		

**Intensidad del color:** Seleccionar una opción

Débil	<input type="radio"/>	Medio	<input type="radio"/>
Ligero	<input type="radio"/>	Fuerte	<input type="radio"/>

#### 2. Evaluación olfativa

**Intensidad del olor**

1  2  3  4  5  6  7

**Descripción del olor**

\_\_\_\_\_

**Intensidad de aroma**

1  2  3  4  5  6  7

**Descripción del aroma**

\_\_\_\_\_

**Defectos de olor y aroma:** Seleccionar una o varias opciones

Láctico	<input type="radio"/>	Huevos podridos	<input type="radio"/>
Moho	<input type="radio"/>	Lías (levaduras)	<input type="radio"/>
Herbáceo	<input type="radio"/>	Sulfuroso	<input type="radio"/>
Picado	<input type="radio"/>	Cocido	<input type="radio"/>
Oxidado	<input type="radio"/>	Otro	<input type="radio"/>

**Persistencia global:** 1 – nada persistente; 7 – muy persistente

1  2  3  4  5  6  7

#### 3. Evaluación gustativa

**Intensidad del dulce**

1  2  3  4  5  6  7

**Intensidad del ácido**

1  2  3  4  5  6  7

**Intensidad de alcohol**

1  2  3  4  5  6  7

**Intensidad de amargo**

1  2  3  4  5  6  7

**Arista presente:** Seleccionar una o varias opciones

Dulce	<input type="radio"/>	Alcohol	<input type="radio"/>
Ácido	<input type="radio"/>	Ninguna	<input type="radio"/>

**Cuerpo y equilibrio:** Consultar guía

1  2  3  4  5  6  7

**Comentarios e impresiones generales**

---



---



---

## E. Anexo: Resultados detallados de la Fase II: Microfermentaciones

Matriz de diseño de experimentos con niveles iniciales de azúcares y NAL

Tratamiento	Miel (g)	Agua (g)	Polen (g)	NAi (mgN/L)	AFi (g/100 g)	AFip (g/100 g)
T00-1	530,5	1471,9	15	66	21,2	22
T00-2	530,5	1471,9	15	66	21,2	
T00-3	530,5	1471,9	15	66	21,2	
T01-1	530,5	1471,9	30	132	21,9	
T01-2	530,5	1471,9	30	132	21,9	
T01-3	530,5	1471,9	30	132	21,9	
T02-1	530,5	1471,9	45	198	22,7	
T02-2	530,5	1471,9	45	198	22,7	
T02-3	530,5	1471,9	45	198	22,7	
T10-1	660,1	1343,3	14	66	26,1	27
T10-2	660,1	1343,3	14	66	26,1	
T10-3	660,1	1343,3	14	66	26,1	
T11-1	660,1	1343,3	28	132	26,9	
T11-2	660,1	1343,3	28	132	26,9	
T11-3	660,1	1343,3	28	132	26,9	
T12-1	660,1	1343,3	42	198	27,6	
T12-2	660,1	1343,3	42	198	27,6	
T12-3	660,1	1343,3	42	198	27,6	
T20-1	802,7	1229,7	14	66	31,2	32
T20-2	802,7	1229,7	14	66	31,2	
T20-3	802,7	1229,7	14	66	31,2	
T21-1	802,7	1229,7	28	132	31,9	
T21-2	802,7	1229,7	28	132	31,9	
T21-3	802,7	1229,7	28	132	31,9	
T22-1	802,7	1229,7	42	198	32,7	
T22-2	802,7	1229,7	42	198	32,7	
T22-3	802,7	1229,7	42	198	32,7	

## Resultados finales obtenidos para NAL, azúcares fermentables y alcoholes en cada tratamiento

Tratamiento	Titulación NAL	HPLC - muestras finales											
	Vol. NaOH (ml)	Área glucosa	Área fructosa	Área etanol	Área glicerol	NALf (mgN/L)	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Etanol (%v/v)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	ΔS	Ye/a
T00-1	1,6	0	0	531108	95802	48,3	0	0	13,66	8,89	107,8	232,8	0,463
T00-2	1,75	0	0	501909	88077	52,8	0	0	12,91	8,17	101,9	232,8	0,438
T00-3	1,6	0	0	503784	91421	48,3	0	0	12,96	8,48	102,2	232,8	0,439
T01-1	3,4	0	0	607546	126479	102,6	0	0	15,63	11,76	123,3	241,1	0,512
T01-2	3,8	0	0	648738	134607	114,6	0	0	16,69	12,52	131,7	241,1	0,546
T01-3	3,45	0	0	587669	131047	109,6	0	0	15,12	12,19	119,3	241,1	0,495
T02-1	6	0	0	358853	107529	181,0	0	0	12,90	9,99	101,8	249,4	0,408
T02-2	6,25	0	0	497268	100005	188,6	0	0	12,79	9,28	100,9	249,4	0,405
T02-3	5,95	0	0	505559	104445	179,5	0	0	13,01	9,70	102,6	249,4	0,411
T10-1	1,8	0	0	554554	114907	54,3	0	0	14,27	10,68	112,6	287,4	0,392
T10-2	1,9	0	0	560676	112355	57,3	0	0	14,43	10,44	113,8	287,4	0,396
T10-3	1,9	0	0	579828	114809	62,0	0	0	14,92	10,67	117,7	287,4	0,410
T11-1	4,15	0	0	509248	108224	125,2	0	0	13,10	10,05	103,4	295,7	0,350
T11-2	4,6	0	0	461334	87608	138,8	0	0	11,87	8,12	93,6	295,7	0,317
T11-3	4,35	0	0	534068	103893	131,2	0	0	13,74	9,65	108,4	295,7	0,367
T12-1	5,6	0	0	604886	133611	169,0	0	0	15,56	12,43	122,8	304,0	0,404
T12-2	5,7	0	0	572763	125696	172,0	0	0	14,74	11,69	116,3	304,0	0,383
T12-3	5,5	0	0	619530	132672	165,9	0	0	15,94	12,34	125,8	304,0	0,414
T20-1	2,1	79577	473013	551669	141656	63,4	7,82	41,29	14,19	13,18	112,0	293,8	0,381
T20-2	2,1	60698	413826	589523	154399	63,4	6,09	36,17	15,17	14,37	119,7	300,6	0,398
T20-3	2,45	84747	498764	574536	145041	73,9	8,30	43,52	14,78	13,50	116,6	291,1	0,401
T21-1	3,8	53429	373443	590524	156071	114,6	5,42	32,68	15,19	14,53	119,9	313,1	0,383
T21-2	3,95	59761	425276	589625	154058	119,2	6,00	37,16	15,17	14,34	119,7	308,0	0,389
T21-3	3,8	50550	381254	597065	149559	114,6	5,15	33,35	15,36	13,92	121,2	312,7	0,388
T22-1	7,15	34855	365494	605175	161331	215,7	3,71	31,99	15,57	15,02	122,9	323,7	0,380
T22-2	7,2	42025	430711	627886	160710	217,2	4,37	37,63	16,16	14,96	127,5	317,4	0,402
T22-3	7,35	40434	415597	598562	154676	221,7	4,22	36,32	15,40	14,40	121,5	318,9	0,381

## F. Anexo: Análisis estadístico de resultados de la Fase II

### Análisis estadístico para la concentración final de nitrógeno asimilable

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	83565.00733	10445.62592	491.92	<.0001
Error	18	382.22207	21.23456		
Total corregido	26	83947.22940			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NAL Media
0.995447	3.764888	4.608097	122.3967

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AZUC	2	1883.34109	941.67054	44.35	<.0001
NITR	2	78444.96349	39222.48174	1847.11	<.0001
AZUC*NITR	4	3236.70276	809.17569	38.11	<.0001

El modelo para la concentración final de nitrógeno asimilable es significativo y el 99,5% de la varianza sobre esta variable es explicada por los factores: concentración inicial de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable. Los resultados presentaron un coeficiente de variación aceptable de 3,8%. Hay evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas para la concentración final de nitrógeno asimilable entre tratamientos. Tanto los factores como la interacción entre ellos presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tests para posición: $\mu_0=0$				
Test	Estadístico		p valor	
T de Student	t	0	Pr >  t	1.0000
Signo	M	-3.5	Pr >=  M	0.2478
Puntuación con signo	S	-8	Pr >=  S	0.8517

Tests para normalidad				
Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.943853	Pr < W	0.1516
Kolmogorov-Smirnov	D	0.144814	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.111424	Pr > W-Sq	0.0784
Anderson-Darling	A-Sq	0.608021	Pr > A-Sq	0.1030

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza ST			
Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
AZUC*NITR	8	3.8031	0.8744

Existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula en las pruebas de posición, Shapiro-Wilk y Bartlett pues en todos los casos el valor p fue mayor que la significancia ( $\alpha = 0,05$ ). Se concluye que los residuales del modelo cumplen con los supuestos de normalidad con media cero y de homocedasticidad.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT	
A	218.230	3	9	
B	183.030	3	3	
C	168.953	3	6	
D	131.743	3	5	
E	116.157	3	8	
E				
E	108.930	3	2	
F	66.880	3	7	
F				
G	F	57.867	3	4
G				
G		49.780	3	1

Se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey que permitió evidenciar las diferencias presentes entre tratamientos para la concentración final de NAL. Se concluyó que las mayores concentraciones de NAL se presentaron para los ensayos T11, T02, T12 y T22 donde la concentración inicial de NAL fue más alta, de igual manera que las concentraciones se obtuvieron para aquellos ensayos donde la concentración inicial correspondió al nivel más bajo del estudio, lo cual corresponde a un resultado esperado.

### Análisis estadístico para el contenido de etanol

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	34.43246667	4.30405833	14.69	<.0001
Error	18	5.27373333	0.29298519		
Total corregido	26	39.70620000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	ETA Media
0.867181	3.735549	0.541281	14.49000

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AZUC	2	7.68328889	3.84164444	13.11	0.0003
NITR	2	1.62462222	0.81231111	2.77	0.0892
AZUC*NITR	4	25.12455556	6.28113889	21.44	<.0001

El modelo para la concentración de etanol es significativo y el 99,5% de la varianza sobre esta variable es explicada por los factores: concentración inicial de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable. Los resultados presentaron un coeficiente de variación aceptable de 3,7%. Hay evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas para

el contenido de etanol entre tratamientos. La concentración de azúcares y la interacción entre los factores presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta y por tanto se considera que la concentración de NAL también ejerce un efecto significativo.

Tests para posición: $\mu_0=0$				
Test	Estadístico		p valor	
T de Student	t	0	Pr >  t	1.0000
Signo	M	-0.5	Pr >=  M	1.0000
Puntuación con signo	S	-2	Pr >=  S	0.9627

Tests para normalidad				
Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.980556	Pr < W	0.8747
Kolmogorov-Smirnov	D	0.097478	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.037779	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.240783	Pr > A-Sq	>0.2500

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza ST			
Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
AZUC*NITR	8	11.0755	0.1975

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	15.8133	3	2
A			
A	15.7100	3	9
A			
A	15.4133	3	6
A			
A	15.2400	3	8
A			
B	14.7133	3	7
B			
B	14.5400	3	4
B			
B	13.1767	3	1
B			
C	12.9033	3	5
C			
C	12.9000	3	3

Existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula en las pruebas de posición, Shapiro-Wilk y Bartlett pues en todos los casos el valor p fue mayor que la significancia ( $\alpha = 0,05$ ). Se concluye que los residuales del modelo cumplen con los supuestos de normalidad con media cero y de homocedasticidad.

El resultado de la prueba de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre los ensayos T00, T11 y T02, que mostraron los valores más bajos para el contenido de etanol, y los ensayos T01, T22, T12 y T21 que mostraron los valores más elevados.

## Análisis estadístico para el contenido de glicerol

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	125.7548000	15.7193500	63.85	<.0001
Error	18	4.4316000	0.2462000		
Total corregido	26	130.1864000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	GLI Media
0.965960	4.249376	0.496185	11.67667

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AZUC	2	90.60548889	45.30274444	184.01	<.0001
NITR	2	7.91806667	3.95903333	16.08	<.0001
AZUC*NITR	4	27.23124444	6.80781111	27.65	<.0001

El modelo para la concentración de glicerol es significativo y el 96,6% de la varianza sobre esta variable es explicada por los factores: concentración inicial de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable. Los resultados presentaron un coeficiente de variación aceptable de 4,2%. Hay evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas para el contenido de glicerol asimilable entre tratamientos. Tanto los factores principales como la interacción entre ellos presentaron un efecto significativo sobre la variable de respuesta.

Tests para posición: $\mu_0=0$				
Test	Estadístico		p valor	
T de Student	t	0	Pr >  t	1.0000
Signo	M	2.5	Pr >=  M	0.4421
Puntuación con signo	S	5	Pr >=  S	0.9070

Tests para normalidad				
Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.956974	Pr < W	0.3147
Kolmogorov-Smirnov	D	0.124768	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.0622	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.413191	Pr > A-Sq	>0.2500

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza ST			
Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
AZUC*NITR	8	7.8077	0.4525

Existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula en las pruebas de posición, Shapiro-Wilk y Bartlett pues en todos los casos el valor p fue mayor que la significancia ( $\alpha = 0,05$ ). Se concluye que los residuales del modelo cumplen con los supuestos de normalidad con media cero y de homocedasticidad.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	14.7933	3	9
A			
A	14.2633	3	8
A			
A	13.6833	3	7
B	12.1567	3	2
B			
B	12.1533	3	6
C	10.5967	3	4
C			
D	9.6567	3	3
D			
D	9.2733	3	5
D			
D	8.5133	3	1

La prueba de Tukey mostró la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos T20, T21 y T22, que presentaron los valores significativamente más altos para el contenido de glicerol, seguidos por los ensayos T01 y T12.

### Análisis estadístico para el rendimiento de la fermentación alcohólica

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	0.05620096	0.00702512	29.40	<.0001
Error	18	0.00430133	0.00023896		
Total corregido	26	0.06050230			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	REND Media
0.928906	3.776147	0.015458	0.409370

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
AZUC	2	0.03147230	0.01573615	65.85	<.0001
NITR	2	0.00159341	0.00079670	3.33	0.0586
AZUC*NITR	4	0.02313526	0.00578381	24.20	<.0001

El modelo para el rendimiento etanol/azúcares es significativo, para el cual el 93% de la varianza en es explicada por los factores: concentración inicial de azúcares y de nitrógeno asimilable. Se encontró un coeficiente de variación aceptable de 3,8%. Existe evidencia estadística para concluir que la concentración inicial de azúcares y la interacción entre los factores principales tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la fermentación alcohólica; por tanto, por jerarquía, la concentración inicial de nitrógeno asimilable también. Existen diferencias significativas entre los tratamientos para el rendimiento.

Tests para posición: $\mu_0=0$				
Test	Estadístico		p valor	
T de Student	t	0	Pr >  t	1.0000
Signo	M	-0.5	Pr >=  M	1.0000
Puntuación con signo	S	-6.5	Pr >=  S	0.8793

Tests para normalidad				
Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.987367	Pr < W	0.9791
Kolmogorov-Smirnov	D	0.102068	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.032198	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.19703	Pr > A-Sq	>0.2500

Test de Bartlett para la homogeneidad de la varianza ST			
Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
AZUC*NITR	8	11.2361	0.1887

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT	
A	0.51767	3	2	
B	0.44667	3	1	
B				
C	0.40800	3	3	
C				
C	0.40033	3	6	
C				
C	0.39933	3	4	
C				
C	0.39333	3	7	
C				
C	0.38767	3	9	
C				
C	0.38667	3	8	
D	0.34467	3	5	

Existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula en las pruebas de posición, Shapiro-Wilk y Bartlett pues en todos los casos el valor p fue mayor que la significancia ( $\alpha = 0,05$ ). Se concluye que los residuales del modelo cumplen con los supuestos de normalidad con media cero y de homocedasticidad.

Existe evidencia estadística para afirmar que el rendimiento obtenido a partir del tratamiento T01 es significativamente mayor al obtenido con los demás tratamientos. Después del tratamiento T01, los rendimientos más altos se presentaron para los ensayos T00 y T02 que corresponden a los ensayos con el nivel más bajo de azúcares evaluados y entre los cuales no se encontraron diferencias significativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los demás tratamientos incluyendo el ensayo T02, para los cuales el rendimiento de la fermentación alcohólica se encontró entre 0,345 – 0,408.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos T11, T21 y T22, los cuales presentaron los valores más bajos.

## G. Anexo: Desarrollo de modelos de regresión y de la optimización

Los polinomios ortogonales para los componentes lineales y cuadráticos de los factores son:

$$AL = \frac{x_A - \bar{x}}{d} = \frac{x_A - 27}{5} \qquad NL = \frac{x_N - 130}{65}$$

$$AC = \left(\frac{x_A - \bar{x}}{d}\right)^2 - \frac{t^2 - 1}{12} = \left(\frac{x_A - 27}{5}\right)^2 - \frac{2}{3} \qquad NC = \left(\frac{x_N - 130}{65}\right)^2 - \frac{2}{3}$$

En las expresiones anteriores,  $x_A$  y  $x_N$  son las concentraciones iniciales de azúcares fermentables y de nitrógeno asimilable, respectivamente;  $\bar{x}$  es el nivel medio evaluado experimental,  $d$  es el espaciamiento entre los niveles del factor y  $t$  es el número de niveles de cada factor.

Las hipótesis a validar sobre los modelos de regresión son:

- $H_0$ : el modelo de regresión no es significativo
- $H_1$ : el modelo de correlación es significativo

### Modelo de regresión para el rendimiento de la fermentación alcohólica

Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	0.05620	0.00703	29.40	<.0001
Error	18	0.00430	0.00023896		
Total corregido	26	0.06050			

Raíz MSE	0.01546	R-cuadrado	0.9289
Media dependiente	0.40937	R-Sq Ajust	0.8973
Coef Var	3.77615		

Dado que el valor  $p$  es menor a la significancia (valor  $p < \alpha = 0,05$ ), existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de regresión entre el rendimiento de la fermentación alcohólica de miel de abejas y las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) y nitrógeno asimilable es significativo, con un coeficiente de correlación aceptable ( $R^2_{ajustado} = 0,8973$ ).

Estimadores de parámetros						
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr >  t	Type I SS
Intercept	1	0.40937	0.00297	137.60	<.0001	4.52477
AL	1	-0.03411	0.00364	-9.36	<.0001	0.02094
AC	1	0.01396	0.00210	6.64	<.0001	0.01053
NL	1	-0.00722	0.00364	-1.98	0.0629	0.00093889
NC	1	-0.00348	0.00210	-1.65	0.1153	0.00065452
ALNL	1	0.00825	0.00446	1.85	0.0810	0.00081675
ALNC	1	0.01569	0.00258	6.09	<.0001	0.00887
ACNL	1	-0.00386	0.00258	-1.50	0.1513	0.00053669
ACNC	1	-0.01094	0.00149	-7.35	<.0001	0.01291

Existe evidencia estadística para afirmar que el intercepto y los componentes AL, AC, ALNC y ACNC tienen un efecto significativo sobre el modelo de regresión para el rendimiento de la fermentación alcohólica. El modelo de regresión se obtiene a partir de los estimadores de los parámetros para los componentes de los factores con efecto significativo.

$$Y_{e/a} = 0,40937 - 0,03411 * AL + 0,01396 * AC + 0,01569 * ALNC - 0,01094 * ACNC$$

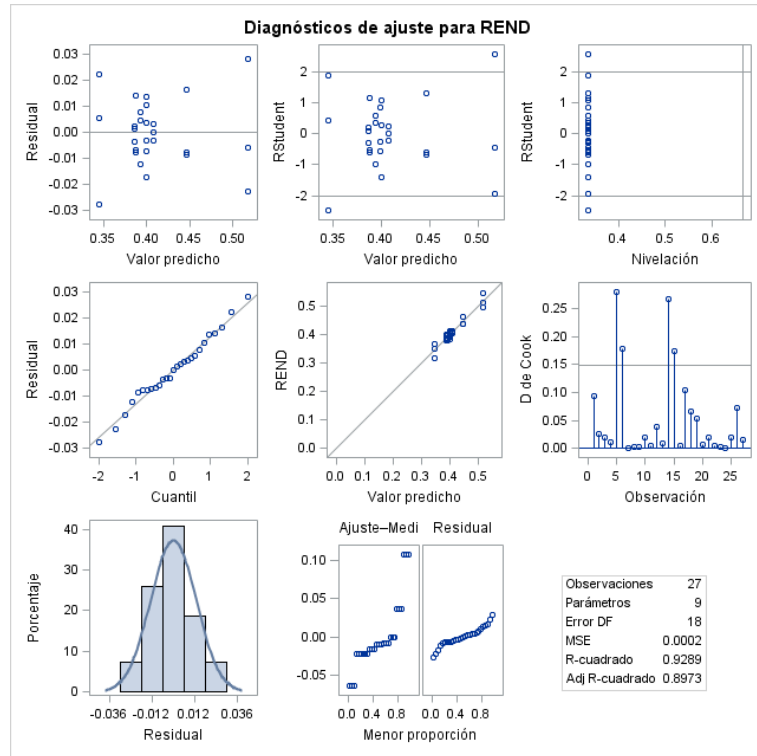
$$Y_{e/a} = 0,40937 - 0,03411 * \left(\frac{x_A - 27}{5}\right) + 0,01396 * \left[\left(\frac{x_A - 27}{5}\right)^2 - \frac{2}{3}\right] + 0,01569 * \left(\frac{x_A - 27}{5}\right) \left[\left(\frac{x_N - 130}{65}\right)^2 - \frac{2}{3}\right] - 0,01094 * \left[\left(\frac{x_A - 27}{5}\right)^2 - \frac{2}{3}\right] \left[\left(\frac{x_N - 130}{65}\right)^2 - \frac{2}{3}\right]$$

Simplificando la anterior ecuación se obtiene el modelo de regresión para el rendimiento etanol/azúcares de la fermentación alcohólica en función de la concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa,  $x_A$ , g/L) y de nitrógeno asimilable ( $x_N$ , mg/L):

$$Y_{e/a} = -3,3015 \times 10^{-1} - 1,0357 \times 10^{-7} x_A^2 x_N^2 + 2,6929 \times 10^{-5} x_A^2 x_N + 6,3357 \times 10^{-6} x_A x_N^2 - 9,0027 \times 10^{-4} x_A^2 - 9,3833 \times 10^{-5} x_N^2 - 1,6473 \times 10^{-3} x_A x_N + 5,2252 \times 10^{-2} x_A + 2,4397 \times 10^{-2} x_N$$

Se observa en los gráficos de diagnóstico que no existe autocorrelación en los residuales del modelo de regresión, así como no se observa sub ni sobre dispersión. Por lo tanto, se puede afirmar que los residuales del modelo son homocedásticos y se distribuyen normalmente. También se observa una correlación lineal entre los resultados

experimentales para el rendimiento de la fermentación alcohólica y los valores predichos por el modelo.



### Optimización de los factores: concentración de azúcares y de nitrógeno asimilable

La optimización de estos factores se realizó en el software SAS 9.4 para la maximización del rendimiento etanol/azúcares de la fermentación alcohólica a partir del modelo de regresión encontrado. Los resultados de la optimización, mostrados en la Tabla siguiente, corresponden a las siguientes condiciones: 22%p/p de azúcares fermentables (glucosa y fructosa) y 123 mg/L de nitrógeno asimilable por la levadura.

Contracción estimada de respuesta máxima para la variable REND				
Coded Radius	Respuesta estimada	Error estándar	Valores de factor no codificado	
			AZUC	NITR
0.0	0.388407	0.015321	27.000000	130.000000
0.1	0.392309	0.015253	26.507935	128.846604
0.2	0.397047	0.015054	26.012685	127.935949
0.3	0.402624	0.014744	25.516069	127.153343
0.4	0.409043	0.014360	25.018770	126.446251
0.5	0.416305	0.013957	24.521091	125.787357
0.6	0.424409	0.013618	24.023181	125.161086
0.7	0.433357	0.013449	23.525125	124.557916
0.8	0.443149	0.013577	23.026970	123.971698
0.9	0.453784	0.014128	22.528746	123.398289
1.0	0.465264	0.015197	22.030472	122.834793

### Modelo de regresión para los azúcares residuales totales

Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	10893	1361.66219	284.45	<.0001
Error	18	86.16533	4.78696		
Total corregido	26	10979			

Raíz MSE	2.18791	R-cuadrado	0.9922
Media dependiente	14.11778	R-Sq Ajust	0.9887
Coef Var	15.49757		

Dado que el valor p es menor a la significancia ( $\text{valor } p < \alpha = 0,05$ ), existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de regresión para el contenido de azúcares residuales totales en función de las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) y nitrógeno asimilable es significativo, con un coeficiente de correlación aceptable ( $R^2_{\text{ajustado}} = 0,9887$ ).

Estimadores de parámetros						
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr >  t	Type I SS
Intercept	1	14.11778	0.42106	33.53	<.0001	5381.41453
AL	1	21.17667	0.51570	41.06	<.0001	8072.12180
AC	1	7.05889	0.29774	23.71	<.0001	2690.70727
NL	1	-1.38611	0.51570	-2.69	0.0150	34.58347
NC	1	0.40611	0.29774	1.36	0.1894	8.90602
ALNL	1	-2.07917	0.63160	-3.29	0.0041	51.87521
ALNC	1	0.60917	0.36465	1.67	0.1121	13.35903
ACNL	1	-0.69306	0.36465	-1.90	0.0735	17.29174
ACNC	1	0.20306	0.21053	0.96	0.3476	4.45301

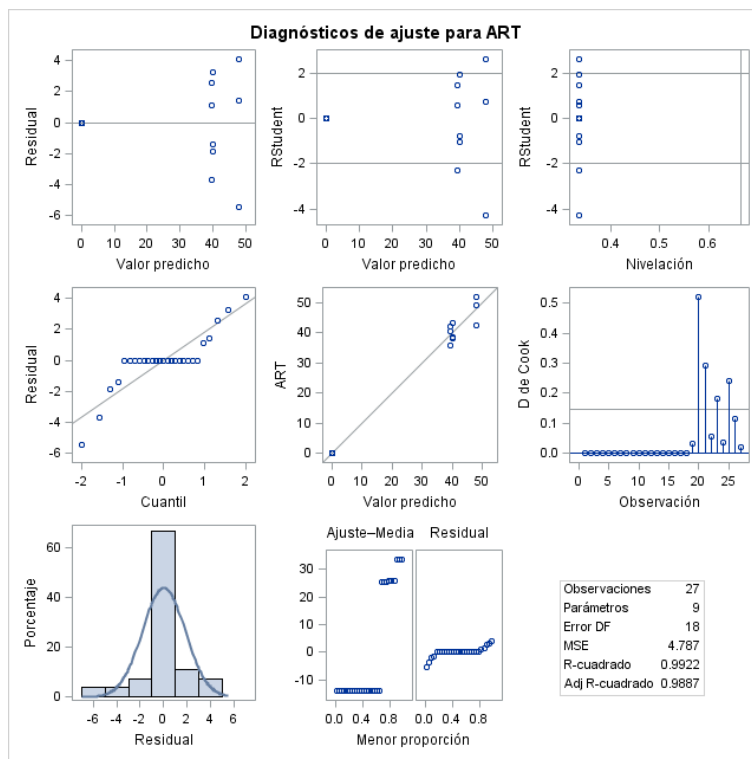
Existe evidencia estadística para afirmar que el intercepto y los componentes AL, AC, NL y ALNL tienen un efecto significativo sobre el modelo de regresión. Procediendo de manera similar:

$$ART = 14,11778 + 21,17667 * AL + 7,05889 * AC - 1,38611 * NL - 2,07917 * ALNL$$

$$ART = 14,11778 + 21,17667 * \left(\frac{x_A - 27}{5}\right) + 7,05889 * \left[\left(\frac{x_A - 27}{5}\right)^2 - \frac{2}{3}\right] - 1,38611 * \left(\frac{x_N - 130}{65}\right) - 2,07917 * \left(\frac{x_A - 27}{5}\right) * \left(\frac{x_N - 130}{65}\right)$$

Simplificando la anterior ecuación se obtiene el modelo de regresión para el contenido de azúcares residuales totales expresado como g/L en función de la concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa,  $x_A$ , g/L) y de nitrógeno asimilable ( $x_N$ , mg/L):

$$ART = 81,2123 + 0,282356x_A^2 - 6,39745 \times 10^{-3}x_Ax_N - 10,1802x_A + 0,151406x_N$$



Se observa en los gráficos de diagnóstico que no existe autocorrelación en los residuales del modelo de regresión, así como no se observa sub ni sobre dispersión. Por lo tanto, se puede afirmar que los residuales del modelo son homocedásticos, además de que se distribuyen normalmente. También se observa una correlación lineal entre los resultados experimentales para el contenido de azúcares residuales totales y los valores predichos por el modelo.

### Modelo de regresión para la concentración final de nitrógeno asimilable

Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	83565	10446	491.92	<.0001
Error	18	382.22207	21.23456		
Total corregido	26	83947			

Raiz MSE	4.60810	R-cuadrado	0.9954
Media dependiente	122.39667	R-Sq Ajust	0.9934
Coef Var	3.76489		

Dado que el valor p es menor a la significancia (valor  $p < \alpha = 0,05$ ), existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de regresión para la concentración final de nitrógeno asimilable en función de las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) y nitrógeno asimilable es significativo, con un coeficiente de correlación aceptable ( $R_{\text{ajustado}}^2 = 0,9934$ ).

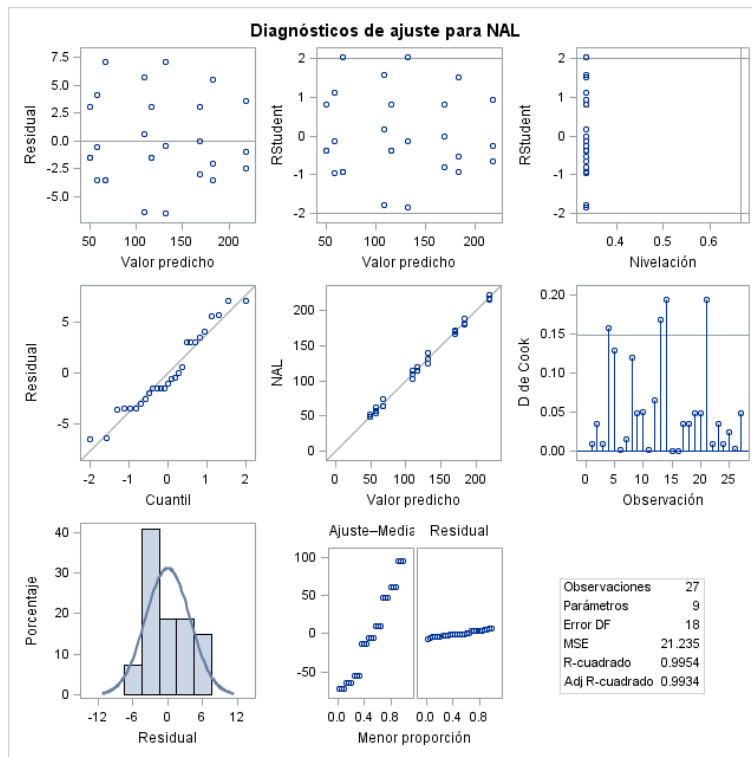
Estimadores de parámetros						
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr >  t	Type I SS
Intercept	1	122.39667	0.88683	138.02	<.0001	404485
AL	1	9.92111	1.08614	9.13	<.0001	1771.71202
AC	1	1.43778	0.62708	2.29	0.0341	111.62907
NL	1	65.94778	1.08614	60.72	<.0001	78284
NC	1	1.72667	0.62708	2.75	0.0131	160.99440
ALNL	1	4.52500	1.33024	3.40	0.0032	245.70750
ALNC	1	3.15389	0.76802	4.11	0.0007	358.09254
ACNL	1	5.20222	0.76802	6.77	<.0001	974.27218
ACNC	1	3.91889	0.44341	8.84	<.0001	1658.63053

Existe evidencia estadística para afirmar que el intercepto y todos los componentes de los factores tienen efecto significativo sobre el modelo de regresión. Procediendo de manera similar:

$$\begin{aligned}
 \text{NAL}_f = & 122,39667 + 9,92111 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) + 1,43778 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] + 65,94778 \left( \frac{x_N - 130}{65} \right) \\
 & + 1,72667 \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] + 4,525 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) \left( \frac{x_N - 130}{65} \right) \\
 & + 3,15389 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] + 5,20222 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] \left( \frac{x_N - 130}{65} \right) \\
 & + 3,91889 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right]
 \end{aligned}$$

Simplificando la anterior ecuación se obtiene el modelo de regresión para la concentración final de nitrógeno asimilable expresada como mg/L en función de la concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa,  $x_A$ , g/L) y de nitrógeno asimilable ( $x_N$ , mg/L):

$$\begin{aligned}
 \text{NAL}_f = & 51,5001 + 3,7102 \times 10^{-5} x_A^2 x_N^2 - 6,4451 \times 10^{-3} x_A^2 x_N - 1,8542 \times 10^{-3} x_A x_N^2 + 1,6385 \times 10^{-1} x_A^2 + 2,2807 \\
 & \times 10^{-2} x_N^2 + 3,2314 \times 10^{-1} x_A x_N - 6,5712 x_A - 3,0106 x_N
 \end{aligned}$$



Se observa en los gráficos de diagnóstico que no existe autocorrelación en los residuales del modelo de regresión, así como no se observa sub ni sobre dispersión. Por lo tanto, se puede afirmar que los residuales del modelo son homocedásticos, además de que se distribuyen normalmente. También se observa una correlación lineal entre los resultados experimentales para la concentración final de nitrógeno asimilable y los valores predichos por el modelo.

### Modelo de regresión para el contenido de etanol

Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	34.43247	4.30406	14.69	<.0001
Error	18	5.27373	0.29299		
Total corregido	26	39.70620			

Raíz MSE	0.54128	R-cuadrado	0.8672
Media dependiente	14.49000	R-Sq Ajust	0.8082
Coef Var	3.73555		

Dado que el valor p es menor a la significancia (valor  $p < \alpha = 0,05$ ), existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de regresión para el contenido de etanol en función de las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) y nitrógeno asimilable es significativo, con un coeficiente de correlación aceptable ( $R^2 = 0,8672$ ;  $R^2_{ajustado} = 0,8082$ ).

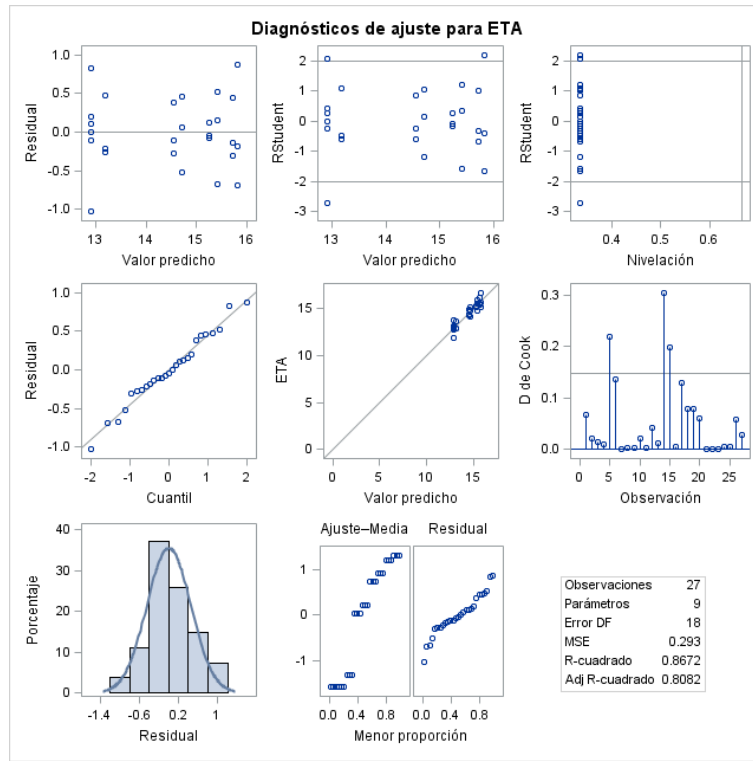
Estimadores de parámetros						
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr >  t	Type I SS
Intercept	1	14.49000	0.10417	139.10	<.0001	5668.92270
AL	1	0.62889	0.12758	4.93	0.0001	7.11902
AC	1	0.10222	0.07366	1.39	0.1821	0.56427
NL	1	0.26556	0.12758	2.08	0.0519	1.26936
NC	1	-0.08111	0.07366	-1.10	0.2853	0.35527
ALNL	1	0.31833	0.15625	2.04	0.0566	1.21603
ALNC	1	0.45778	0.09021	5.07	<.0001	7.54418
ACNL	1	-0.08556	0.09021	-0.95	0.3555	0.26351
ACNC	1	-0.38611	0.05208	-7.41	<.0001	16.10083

Existe evidencia estadística para afirmar que el intercepto y los componentes AL, ALNC y ACNC tienen efecto significativo sobre el modelo de regresión. Procediendo de manera similar:

$$ETA = 14,49 + 0,62889 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) + 0,45778 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] - 0,38611 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right]$$

Simplificando la anterior ecuación se obtiene el modelo de regresión para el contenido de etanol expresado como %v/v en función de la concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa,  $x_A$ , g/L) y de nitrógeno asimilable ( $x_N$ , mg/L):

$$ETA = -33,8179 - 3,6555 \times 10^{-6} x_A^2 x_N^2 + 9,5042 \times 10^{-4} x_A^2 x_N + 2,1907 \times 10^{-4} x_A x_N^2 - 5,1481 \times 10^{-2} x_A^2 - 3,1890 \times 10^{-3} x_N^2 - 5,6957 \times 10^{-2} x_A x_N + 3,2110 x_A + 8,2914 \times 10^{-1} x_N$$



Se observa en los gráficos de diagnóstico que no existe autocorrelación en los residuales del modelo de regresión, así como no se observa sub ni sobre dispersión. Por lo tanto, se puede afirmar que los residuales del modelo son homocedásticos, además de que se distribuyen normalmente. También se observa una correlación lineal entre los resultados experimentales para el contenido de etanol y los valores predichos por el modelo.

**Modelo de regresión para el contenido de glicerol**

Análisis de la varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	125.75480	15.71935	63.85	<.0001
Error	18	4.43160	0.24620		
Total corregido	26	130.18640			

Raíz MSE	0.49619	R-cuadrado	0.9660
Media dependiente	11.67667	R-Sq Ajust	0.9508
Coef Var	4.24938		

Dado que el valor p es menor a la significancia ( $\text{valor } p < \alpha = 0,05$ ), existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de

regresión para el contenido de glicerol en función de las concentraciones iniciales de azúcares (glucosa y fructosa) y nitrógeno asimilable es significativo, con un coeficiente de correlación aceptable ( $R_{\text{ajustado}}^2 = 0,9508$ ).

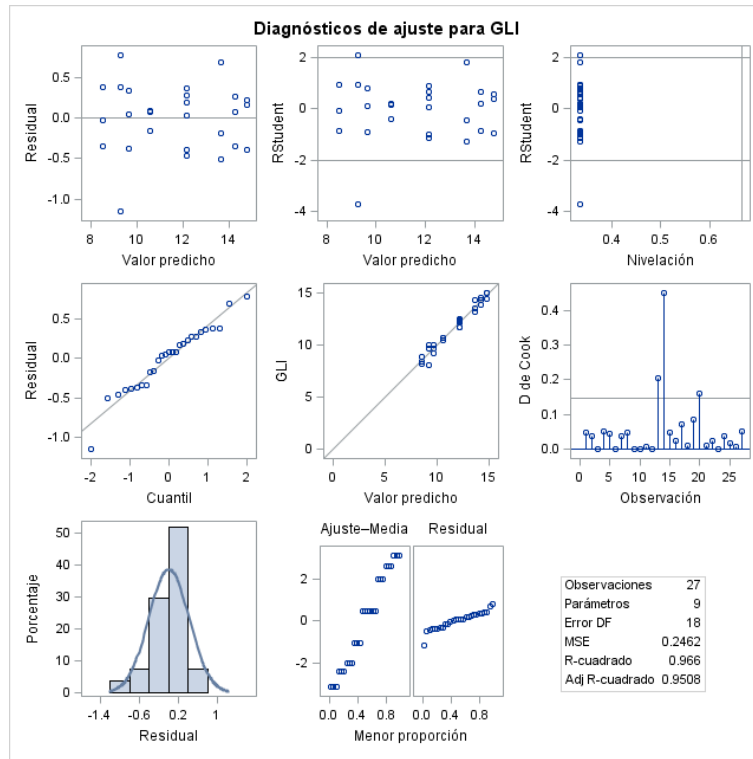
Estimadores de parámetros						
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr >  t	Type I SS
Intercept	1	11.67667	0.09549	122.28	<.0001	3681.30270
AL	1	2.06889	0.11695	17.69	<.0001	77.04542
AC	1	0.50111	0.06752	7.42	<.0001	13.56007
NL	1	0.63500	0.11695	5.43	<.0001	7.25805
NC	1	-0.11056	0.06752	-1.64	0.1189	0.66002
ALNL	1	-0.00833	0.14324	-0.06	0.9542	0.00083333
ALNC	1	0.50778	0.08270	6.14	<.0001	9.28218
ACNL	1	-0.07167	0.08270	-0.87	0.3976	0.18490
ACNC	1	-0.40556	0.04775	-8.49	<.0001	17.76333

Existe evidencia estadística para afirmar que el intercepto y los componentes AL, AC, NL, ALNC y ACNC tienen efecto significativo sobre el modelo de regresión. Procediendo de manera similar:

$$\begin{aligned}
 GLI = & 11,67667 + 2,06889 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) + 0,50111 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] + 0,63500 \left( \frac{x_N - 130}{65} \right) \\
 & + 0,50778 \left( \frac{x_A - 27}{5} \right) \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] - 0,40556 \left[ \left( \frac{x_A - 27}{5} \right)^2 - \frac{2}{3} \right] \left[ \left( \frac{x_N - 130}{65} \right)^2 - \frac{2}{3} \right]
 \end{aligned}$$

Simplificando la anterior ecuación se obtiene el modelo de regresión para el contenido de glicerol expresado como g/L en función de la concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa,  $x_A$ , g/L) y de nitrógeno asimilable ( $x_N$ , mg/L).

$$\begin{aligned}
 GLI = & -34,1463 - 3,8396 \times 10^{-6} x_A^2 x_N^2 + 9,9830 \times 10^{-4} x_A^2 x_N + 2,3138 \times 10^{-4} x_A x_N^2 - 3,4030 \times 10^{-2} x_A^2 - 3,3841 \\
 & \times 10^{-3} x_N^2 - 6,0158 \times 10^{-2} x_A x_N + 2,5899 x_A + 8,8963 \times 10^{-1} x_N
 \end{aligned}$$



Se observa en los gráficos de diagnóstico que no existe autocorrelación en los residuales del modelo de regresión, así como no se observa sub ni sobre dispersión. Por lo tanto, se puede afirmar que los residuales del modelo son homocedásticos, además de que se distribuyen normalmente. También se observa una correlación lineal entre los resultados experimentales para el contenido de glicerol y los valores predichos por el modelo.

## H. Anexo: Datos y resultados de las Fases II y de experimentación

Balance de materia y concentraciones iniciales de glucosa, fructosa y nitrógeno asimilable para las fermentaciones a escala de laboratorio y piloto

	Ensayo 1	Ensayo 2	Piloto
<b>Miel (g)</b>	940,2	800,9	21540
<b>Agua (g)</b>	2313,6	1950	51900
<b>Polen (g)</b>	141,9	125,3	3400
<b>Total (g)</b>	3395,7	2876,2	76840
<b>Total (L)</b>	3,1	2,6	69855
<b>Glucosa (g/L)</b>	111,5	112,2	112,9
<b>Fructosa (g/L)</b>	123,1	123,8	124,6
<b>NAL (mg/L)</b>	117,9	122,9	124,8

### Monitoreo de la fermentación alcohólica en el bioreactor (Ensayo 1)

Tiempo (h)	T (°C)	pH	°Brix	Vol NaOH (ml)	NAL (mg/L)
0	25	4,19	21,2	-	117,9
18	25,3	3,97	20,4	1,7	65,80
42	25,4	3,83	18,4	1,55	60,00
91	25,4	3,73	13,2	1,35	52,26
186	25,6	3,78	9,2	1,5	58,06
259	25,9	3,81	9,2	1,5	58,06
331	25,7	3,82	9,2	1,5	58,06

### Monitoreo de azúcares y alcoholes mediante HPLC (Ensayo 1)

Tiempo (h)	ÁREAS - HPLC				Glucosa g/L	Fructosa g/L	Glicerol g/L	Etanol %vol.
	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol				
0	-	-	-	-	111,5	123,1	0,00	0,00
18	862424	1210508	10395	300886	79,90	105,07	0,90	7,73
42	661669	1073435	32757	399881	61,42	93,21	2,99	10,28
91	184103	562512	59869	581294	17,45	49,03	5,53	14,96
186	0	0	75323	682583	0,00	0,00	6,98	17,57
259	0	0	78577	774682	0,00	0,00	7,28	19,94
331	0	0	73763	715500	0,00	0,00	6,83	18,42

**Monitoreo de la fermentación alcohólica en el bioreactor (Ensayo 2)**

Tiempo (h)	T (°C)	pH	°Brix	Vol NaOH (ml)	NAL (mg/L)
0	25	4,25	22	-	122,9
20	25,7	4	21,2	2	71,61
43	24,7	3,9	19,2	1,9	68,03
68	24,8	3,83	16,6	1,75	62,66
91	24,9	3,8	14,4	1,55	55,50
164	24,9	3,78	9,8	1,7	60,87
211	24,9	3,83	9,8	1,7	60,87
259	25	3,84	9,8	1,7	60,87

**Monitoreo de azúcares y alcoholes mediante HPLC (Ensayo 2)**

Tiempo (h)	ÁREAS - HPLC				Glucosa g/L	Fructosa g/L	Glicerol g/L	Etanol %vol.
	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol				
0	-	-	-	-	112,2	123,8	0,00	0,00
18	867970	1207164	10933	299233	80,41	104,78	0,95	7,69
42	728309	1163388	35423	413678	67,55	100,99	3,24	10,64
91	389801	786414	44294	475018	36,39	68,39	4,07	12,22
186	206462	573438	55287	524092	19,51	49,97	5,10	13,48
259	0	0	80898	473287	0,00	0,00	6,18	15,27
331	0	0	68414	662983	0,00	0,00	6,33	17,06

**Monitoreo de la fermentación alcohólica a escala piloto**

Tiempo (h)	pH	°Brix	Vol NaOH (ml)	NAL (mg/L)
0	4,2	22,2	-	124,8
24	4,02	19,8	1,75	62,7
48	3,94	17,6	1,65	59,1
72	3,93	14	1,35	58,2
96	3,94	11,8	1,6	57,3
144	3,94	10,5	1,7	60,9
240	3,94	10,5	1,8	64,4
360	3,96	10,5	1,95	69,8
408	3,96	10,5	1,65	59,1
456	3,96	10,5	1,8	64,4

### Monitoreo de azúcares y alcoholes mediante HPLC (Escala piloto)

Tiempo (h)	ÁREAS - HPLC				Glucosa g/L	Fructosa g/L	Glicerol g/L	Etanol %vol.
	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol				
0	1152214	1506778	0	0	106,58	130,69	0,00	0,00
24	675093	1088456	35284	90471	62,65	94,51	3,30	2,33
48	313731	708167	79396	351402	29,38	61,62	7,43	9,06
72	132220	478306	79339	358486	12,67	41,75	7,42	9,24
96	65058	327713	84066	402029	6,49	28,72	7,86	10,36
141	0	0	-	-	0,00	14,36	8,28	11,74
240	0	0	93000	508778	0,00	0,00	8,70	13,11
360	0	0	87080	472774	0,00	0,00	8,14	12,18
408	0	0	87970	479797	0,00	0,00	8,23	12,36
456	0	0	89276	482587	0,00	0,00	8,35	12,44

### Acidez volátil de los hidromieles obtenidos en el bioreactor y a escala piloto

	Vol NaOH	Acidez volátil (g/L)
Bioreactor Ensayo 1	2,6	0,15
	2,6	0,15
Bioreactor Ensayo 2	2,6	0,15
	2,15	0,12
Piloto	4,6	0,26
	5,2	0,29

### Análisis de varianza (ANOVA) sobre la acidez volátil

Fuente de variación	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Entre grupos	0,02432012	2	0,01216006	41,6577778	0,0064796	9,5520945
Dentro de los grupos	0,00087571	3	0,0002919			
Total	0,02519583	5				

**Monitoreo del crecimiento celular de *S. cerevisiae* durante la fermentación a escala de laboratorio**

Tiempo (h)	0,001	0,0001	0,00001	0,000001	0,0000001	0,00000001
	Número de colonias					
0	697	161,5	17,0	3,0	0,0	0,0
18	-	222,5	24,0	4,5	0,0	0,0
42	-	209,5	158,5	10,0	3,0	0,0
67	-	1536,0	290,5	41,0	5,0	0,0
139		1544,0	262,0	34,5	2,5	0,0
186			258,0	34,0	4,5	2,5
234		1000,0	171,5	19,5	1,5	0,0
331		924,5	130,0	16,0	5,0	0,0

I.

**J. Recuento celular de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica**

Tiempo (h)	UFC/ml					Promedio
	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	UFC/ml
0	1,62E+06	1,70E+06	3,00E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,66E+06
18	2,23E+06	2,40E+06	4,50E+06	0,00E+00	0,00E+00	2,31E+06
42	2,10E+06	1,59E+07	1,00E+07	3,00E+07	0,00E+00	1,59E+07
67	1,54E+07	2,91E+07	4,10E+07	5,00E+07	0,00E+00	2,91E+07
139	1,54E+07	2,62E+07	3,45E+07	2,50E+07	0,00E+00	3,04E+07
186	0,00E+00	2,58E+07	3,40E+07	4,50E+07	2,50E+08	2,99E+07
234	1,00E+07	1,72E+07	1,95E+07	1,50E+07	0,00E+00	1,83E+07
331	9,25E+06	1,30E+07	1,60E+07	5,00E+07	0,00E+00	1,45E+07

# I. Anexo: Análisis estadístico sobre los modelos cinéticos ajustados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) sobre los modelos de ajuste cinético y los estimadores de los parámetros con una significancia del 5%, utilizando el software OriginPro 2017.

Las hipótesis de interés son:

$H_0$ : El modelo ajustado no es significativo

$H_1$ : El modelo ajustado es significativo

$H_0$ : Los parámetros estimados del modelo no son significativos

$H_1$ : Los parámetros estimados del modelo son significativos

## Modelo logístico de 4 parámetros para la regresión de la cinética de crecimiento celular

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	4	1583,09135	395,77284	161634,87084	6,18675E-6
	Residual	2	0,0049	0,00245		
	Uncorrected Total	6	1583,09624			
	Corrected Total	5	9,11888			

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	A1	14,32992	0,04906	292,10875	1,17193E-5	0,4496
	A2	17,2448	0,03237	532,66323	3,52446E-6	0,33882
	x0	32,01573	0,90001	35,57284	7,89312E-4	0,5079
	p	4,28272	0,30778	13,91484	0,00513	0,45911
	EC20	23,16245	1,00674			
	EC50	32,01573	0,90001			
	EC80	44,25297	1,23087			

Con una significancia de  $\alpha = 0,05$  existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo logístico ajustado para la regresión del LN UFC/mL en función del tiempo de fermentación es significativo y que todos los estimadores de los parámetros tienen efecto significativo sobre el modelo.

B	
Number of Points	6
Degrees of Freedom	2
Reduced Chi-Sqr	0,00245
Residual Sum of Squares	0,0049
R-Square(COD)	0,99946
Adj. R-Square	0,99866
Fit Status	Succeeded(100)

El modelo presentó un alto coeficiente de determinación ajustado y una baja suma de residuales cuadrados lo que demuestra una elevada bondad de ajuste del modelo.

### Modelo de Gompertz para la cinética de crecimiento microbiano ( $\mu$ vs. $S$ )

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	3	0,00674	0,00225	3,02199E6	3,30908E-7
	Residual	2	1,48662E-9	7,43308E-10		
	Uncorrected Total	5	0,00674			
	Corrected Total	4	0,00376			

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	a	0,0741	8,04005E-5	921,61018	1,17735E-6	0,90631
	xc	147,6379	0,06695	2205,19739	2,05639E-7	0,83522
	k	0,05182	1,04186E-4	497,34099	4,04286E-6	0,69406

Con una significancia de  $\alpha = 0,05$  existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo de Gompertz ajustado para la cinética de crecimiento celular es significativo y que todos los estimadores de los parámetros tienen efecto significativo sobre el modelo.

B	
Number of Points	5
Degrees of Freedom	2
Reduced Chi-Sqr	7,43308E-10
Residual Sum of Squares	1,48662E-9
R-Square(COD)	1
Adj. R-Square	1
Fit Status	Succeeded(100)

El modelo presentó un alto coeficiente de determinación ajustado y una baja suma de residuales cuadrados lo que demuestra una elevada bondad de ajuste del modelo.

### Modelo logístico de 3 parámetros para el crecimiento microbiano ( $\mu$ vs. $S$ )

		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
B	Regression	3	0,00674	0,00225	3,02199E6	3,30908E-7
	Residual	2	1,48662E-9	7,43308E-10		
	Uncorrected Total	5	0,00674			
	Corrected Total	4	0,00376			

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	a	0,0741	8,04005E-5	921,61018	1,17735E-6	0,90631
	xc	147,6379	0,06695	2205,19739	2,05639E-7	0,83522
	k	0,05182	1,04186E-4	497,34099	4,04286E-6	0,69406

Con una significancia de  $\alpha = 0,05$  existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y por tanto se puede afirmar que el modelo logístico de 3 parámetros ajustado para la cinética de crecimiento celular es significativo y que todos los estimadores de los parámetros tienen efecto significativo sobre el modelo.

	B
Number of Points	5
Degrees of Freedom	2
Reduced Chi-Sqr	7,43308E-10
Residual Sum of Squares	1,48662E-9
R-Square(COD)	1
Adj. R-Square	1
Fit Status	Succeeded(100)

El modelo presentó un alto coeficiente de determinación ajustado y una baja suma de residuales cuadrados lo que demuestra una elevada bondad de ajuste del modelo.



## Bibliografía

- Abernathy, D. (2009). Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. *Journal of the Institute of ...*, 1–6. <http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00356.x>
- Aerny, J. (1996). Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, 38(3), 161–165.
- Alexandre, H., & Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 20–27. <http://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442>
- Altiook, D. (2004). *Kinetic modelling of lactic acid production from whey*. Izmir Institute of Technology.
- American Mead Makers Association. (2011). Mead styles. <http://www.meadmakers.org/styles.htm>
- American Mead Makers Association. (2014). American Mead Makers Association's first annual mead industry report. <http://www.meadmakers.org/images/2014Report.pdf>
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., & Ancin-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chemistry*, 103(4), 1312–1318. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.037>
- Assar, R., Vargas, F., & Sherman, D. J. (2012). Reconciling competing models: a case study of wine fermentation kinetics. In K. Horimoto, M. Nakatsui, & N. Iaj Popov (Eds.), *Algebraic and Numeric Biology* (pp. 98–1116). Springer Berlin Heidelberg. [http://doi.org/10.1007/978-3-642-28067-2\\_6](http://doi.org/10.1007/978-3-642-28067-2_6)
- Bahiru, B., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2001). Chemical and nutritional properties of “tej”, an indigenous ethiopian honey wine: variations within and between production units. *The Journal of Food Technology in Africa*, 6(Julio-Sept), 104–108. Retrieved from <http://www.bioline.org.br/request?ft01028>
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Balli, D., Flari, V., Sakellarakis, E., Schoina, V., Iconomopoulou, M., Bekatorou, a., & Kanellaki, M. (2003). Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. *Process Biochemistry*, 39, 499–506. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00133-X](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00133-X)
- Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2009). Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(2), 99–104. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.02.017>
- Baroň, M. (2011). Yeast assimilable nitrogen in South Moravian grape musts and its effect

- on acetic acid production during fermentation. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(6), 603–609.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4a ed.). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Bellik, Y., & Boukraa, L. (2013). *Honey in traditional and modern medicine*. (L. Boukraa, Ed.) (First, Vol. 11). CRC Press. <http://doi.org/10.1201/b15608>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozes, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 996–1002. <http://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Bely, M., Rinaldi, A., & Dubourdieu, D. (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 407–512. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70141-3](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70141-3)
- Bénes, I., Furdíková, K., & Šmogrovicová, D. (2015). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on the profile of volatile organic compounds of blossom honey mead. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(4), 334–339. <http://doi.org/10.17221/48/2015-CJFS>
- Blanco, A., Quicazán, M., & Cuenca, M. (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. *Vitae*, 19(1), 234–236.
- Bogdanov, S. (2009). *Harmonised methods of the International Honey Commission*. Retrieved from <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Burin, V. M., Gomes, T. M., Caliari, V., Rosier, J. P., & Bordignon Luiz, M. T. (2015). Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *Microchemical Journal*, 122. <http://doi.org/10.1016/j.microc.2015.03.011>
- Caridi, A., Fuda, S., Postorino, S., Russo, M., & Sidari, R. (1999). Selection of *Saccharomyces sensu stricto* for mead production. *Food Technology and Biotechnology*. Retrieved from <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/1999/July-September/37-3-9.pdf>
- CODEX STAN 12-1981. Codex Norma para la miel (2001). Comité del Codez sobre Azúcares (CSS).
- Comisión Europea. (2007). Czwórniak. Polonia.
- Cuenca, M., Blanco, A., Pulido, N., & Serrato, J. C. (2014). Comportamiento de la Fermentación Alcohólica de Miel Adicionando Clavo (*Eugenia Caryophyllata*) y Ají (*Capsicum Annuum*) Behavior of Alcoholic Honey Fermentation by Adding Clove (*Eugenia Caryophyllata*) and Chili (*Capsicum Annuum*), 67(2), 904–906.
- Cuenca, M., Fuenmayor, C., Benedetti, S., & Buratti, S. (2015). Mead fermentation process monitoring by using analytical semiobjective techniques. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 31–36. <http://doi.org/10.3303/CET1543006>
- D'Amato, D., Corbo, M. R., Del Nobile, M. A., & Sinigaglia, M. (2006). Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(10), 1152–1157. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01128.x>
- David, R., Dochain, D., Mouret, J. R., Vande Wouwer, A., & Sablayrolles, J. M. (2011). Modeling of the aromatic profile in wine-making fermentation: The backbone equations. *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*, 18(PART 1), 10597–10602. <http://doi.org/10.3182/20110828-6-IT-1002.01189>
- Dávila Rodríguez, M. A., Blanco Paz, A. J., & Quicazán Sierra, M. C. (2014). Uso de células inmovilizadas en la elaboración de hidromiel con adición de agraz (*Vaccinium*

- meridionale). In *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID 2014* (p. 6). DeNittis, M., Zanoni, B., Minati, J. L., Gorra, R., & Ambrosoli, R. (2011). Modelling Biolog profiles' evolution for yeast growth monitoring in alcoholic fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 52(2), 96–103. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02961.x>
- Dickinson, J. R., & Schweizer, M. (2004). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. (R. J. Dickinson & M. Schweizer, Eds.) (2a ed.). CRC Press.
- Diehl, K. (n.d.). Finnish spring mead (Sima).
- Etaio, I., Pérez, F., Albisu, M., Salmerón, J., Ojeda, M., & Gastón, E. (2007). *Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa. Servicio central de publicaciones del Gobierno Vasco* (1st ed.). País Vasco: Vitoria-Gasteiz.
- Freshney, R. I. (2006). Basic principles of cell culture. In G. Vunjak-Novakovic & R. I. Freshney (Eds.), *Culture of cells for tissue engineering* (pp. 3–22). John Wiley & Sons. Retrieved from <http://histologia.ugr.es/pdf/0471629359.pdf>
- Fuenmayor, C., Zuluaga, C., Diaz, C., Quicazán, M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003–4014.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., & Salinas, M. R. (2011). Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. *Food Chemistry*, 124(1), 106–116. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.112>
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. (2010). Mead production: comparison of different production scales. In *6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-industry* (pp. 244–247). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10198/3680>
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. M. (2013). Optimization of mead production using response surface methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 680–686. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.034>
- Hernández, C., Blanco, A., Cuenca, M., & Serrato, J. C. (2014). Aprovechamiento de Miel Cristalizada en la Producción de Hidromiel Use of Crystallized Honey Upon Mead Production, 67(2), 911–913.
- Hernández, C., Blanco, A., & Quicazán, M. (2014). Establecimiento de las condiciones de elaboración de hidromiel mediante diseño de experimentos. *Memorias Encuentro Nacional de Investigación Y Desarrollo - ENID*, 1, 1–6. Retrieved from ISSN 8719-5712
- Hernández, C. Y., Serrato, J. C., & Quicazan, M. C. (2015). Evaluation of physicochemical and sensory aspects of mead, produced by different nitrogen sources and commercial yeast. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 1–6. <http://doi.org/10.3303/CET1543001>
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 150–160. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x>
- Houston, D. (2006). Mead a.k.a. Honeywine.
- ICONTEC. NTC 708 Bebidas alcohólicas. Vinos de frutas (2000).
- Iglesias, A., Pascoal, A., Choupina, A., Carvalho, C., Feás, X., & Estevinho, L. (2014). Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, 19(8), 12577–12590.

- <http://doi.org/10.3390/molecules190812577>
- Instrução Normativa No. 3 (2001). Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geléia Real, de Geléia Real Liofilizada, de Pólen Apícola, de Própolis, de Extrato de Própolis. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.
- Jackson, R. (2009). *Wine tasting: a professional handbook* (2a ed.). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374181-3>
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications*. Vasa. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-373646-8.50004-4>
- Kempka, A. P., Frühauf, M., Pagliarini, M. A., Matiello, J. A., Fachianello, F., & Prestes, R. C. (2015). Influence of the addition of pollen and brewer ' s yeast on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in honey-must. *International Food Research Journal*, 22(3), 1288–1292. Retrieved from [http://www.ifrj.upm.edu.my/22\(03\)2015/\(56\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22(03)2015/(56).pdf)
- Kime, R., Morse, R., & Steinkraus, K. (1998). Mead: History, current technology and prospects. *American Bee Journal*, 138(2), 121–123.
- Kostov, G., Popova, S., Gochev, V., Koprinkova-Hristova, P., Angelov, M., & Georgieva, A. (2012). Modeling of batch alcohol fermentation with free and immobilized yeasts *Saccharomyces cerevisiae* 46 EVD. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(3), 3021–3030. <http://doi.org/10.5504/bbeq.2012.0025>
- Lindisfarne Ltd. (2011). The history of mead.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of microorganisms* (13a ed.). Benjamin Cummings.
- Malherbe, S., Fromion, V., Hilgert, N., & Sablayrolles, J. M. (2004). Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(3), 261–272. <http://doi.org/10.1002/bit.20075>
- Manikandan, K., & Viruthagiri, T. (2010). Kinetic and optimization studies on ethanol production from corn flour. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3(2), 65–69.
- Martínez-Moreno, R., Quirós, M., Morales, P., & Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 128–135. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.020>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175–1188. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.04.007>
- McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). *Practical fermentation technology*. (B. McNeil & L. M. Harvey, Eds.), *Practical Fermentation Technology*. <http://doi.org/10.1002/9780470725306>
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A., & Mendes-Faia, A. (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 193–198. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016>
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 540–5. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>
- Miller, J. (1994). *The bee's lees: A collection of mead recipes*. (G. J. Schaller, Ed.) (First). California.
- Muik, B., Edelmann, A., Lendl, B., & Ayora-Cañada, M. J. (2002). Determination of yeast assimilable nitrogen content in wine fermentations by sequential injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374(1), 167–

172. <http://doi.org/10.1007/s00216-002-1418-4>
- Navrátil, M., Šturdík, E., & Gemeiner, P. (2001). Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 23(12), 977–982. <http://doi.org/10.1023/A:1010571208324>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger principles of biochemistry* (4a ed.). W.H. Freeman.
- NMX-FF-094-1998-SCFI (2007). Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - Polen - (Pollínis). Norma mexicana, México.
- Novo, M., Gonzalez, R., Bertran, E., Martínez, M., Yuste, M., & Morales, P. (2014). Improved fermentation kinetics by wine yeast strains evolved under ethanol stress. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 166–172. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.004>
- NSO 67.19.01. Miel de abejas. Especificaciones (2008). El Salvador: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- O’Kennedy, K., & Reid, G. (2008). Yeast nutrient management in winemaking. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, (537), 92–100. Retrieved from [www.winebiz.com.au](http://www.winebiz.com.au)
- O’Neill, B., van Heeswijck, T., & Muhlack, R. (2011). Models for predicting wine fermentation kinetics. In *CHEMECA 2011* (p. 16). Sidney. Disponible en: <http://www.conference.net.au/chemeca2011/papers/463.pdf>
- Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3), 159–165. <http://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>
- Olaoye, O. S., & Kolawole, O. S. (2013). Modeling of the kinetics of ethanol formation from glucose biomass in batch culture with a non structured model. *International Journal of Engineering Research and Application (IJERA)*, 3(4), 562–565.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. (2015). *Compendium of international methods of wine and must analysis - 2* (Vol. 1). Retrieved from [http://www.oiv.int/oiv/files/5\\_Publications/5\\_Publications/OIV/EN/Compendium\\_2015\\_EN\\_vol1.pdf](http://www.oiv.int/oiv/files/5_Publications/5_Publications/OIV/EN/Compendium_2015_EN_vol1.pdf)
- Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2057–2063. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.028>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2011). *Effect of nitrogen supplementation on yeast fermentation performance and mead quality*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10198/9978>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2013). High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology*, 33(1), 114–123. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.006>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 21–30. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.005>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J. M., Estevinho, L. 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*, 121(1), 122–128. <http://doi.org/10.1002/jib.184>
- Perez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T., & Herrera, A. (1994). Quality

- evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chemistry*, 51(2), 207–210. [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90258-5](http://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90258-5)
- Persano Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35, S38–S81. <http://doi.org/10.1051/apido:2004049>
- Phisalaphong, M., Srirattana, N., & Tanthapanichakoon, W. (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 28(1), 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>
- Piana, M. L., Persano Oddo, L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., & Guyot Declerck, C. (2006). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35, S26–S37. <http://doi.org/10.1051/apido:2004048>
- Prakash, M. (2010). A mathematical model for ethanol fermentation by mutant *Neurospora crassa*. *Research Journal of Biotechnology*, 5(2), 64–68.
- Prochile (2014, Agosto). El mercado del vino en Colombia. Oficina comercial en Colombia. [http://www.prochile.gob.cl/wp-content/files\\_mf/1412259637FMP\\_Colombia\\_Vinos\\_2014.pdf](http://www.prochile.gob.cl/wp-content/files_mf/1412259637FMP_Colombia_Vinos_2014.pdf)
- Qureshi, N., & Tamhane, D. V. (1985). Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 280–281. <http://doi.org/10.1007/BF00252704>
- Qureshi, N., & Tamhane, D. V. (1986). Mead production by continuous series reactors using immobilized yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 438–439. <http://doi.org/10.1007/BF02346056>
- Qureshi, N., & Tamhane, D. V. (1987). Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 27–30. <http://doi.org/10.1007/BF00257249>
- Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A. P., Dias, T., & Estevinho, L. M. (2011). *Mead production: Tradition versus modernity. Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 63). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00004-X>
- Ramon-Portugal, F., Delia-Dupuy, M.-L., Pingaud, H., & Riba, J. P. (1997). Kinetic study and mathematical modelling of the growth of *S. cerevisiae* 522D in presence of K2 killer protein. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 68(2), 195–201. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199702\)68:2<195::AID-JCTB579>3.3.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199702)68:2<195::AID-JCTB579>3.3.CO;2-5)
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1990). *Yeast technology* (2a ed.). New York: Van Nostrand Reinhold. <http://doi.org/10.1007/978-94-011-9771-7>
- Revinskaya, E. (2013). Russian kitchen: Medovukha.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology* (Second). Chichester: Wiley.
- Rinaldi, S., Tiano, A., Serban, S., Pittson, R., Lajic, Z., Politi, H., ... Cavazza, A. (2006). Monitoring wine quality and fermentation kinetics with innovative technologies. In *XXIX Congreso mundial de la viña y el vino*.
- Roldán, A., Van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), 574–582. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.045>
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418–424. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>
- Scanes, K. T., Hohmann, S., & Prior, B. a. (1998). Glycerol Production by the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 19(1), 17–24. Retrieved from <http://www.sasev.org/journal-sajev/sajev-articles/volume-19->

- 1/art3\nglycerol\nin\nwine.pdf
- Sener, A., Canbas, A., & Unal, U. (2007). The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 349–354. Retrieved from [http://caaeii.cl/wp-content/uploads/2012/07/Sener\\_et\\_al.\\_2007.pdf](http://caaeii.cl/wp-content/uploads/2012/07/Sener_et_al._2007.pdf)
- Sroka, P., & Tuszyński, T. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104(3), 1250–1257. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.046>
- Strong, G., Ruud, S., England, K., Schramm, K., Stock, C., Bakulic, P., & Zapolski, M. (2014). *BJCP Mead exam study guide*. Retrieved from [http://www.bjcp.org/mead/Mead\\_Study.pdf](http://www.bjcp.org/mead/Mead_Study.pdf)
- Stross, B., & Kerr, J. (1990). Notes on the Maya Vision Quest Through Enema. *The Maya Vase Book Vol II: A Corpus of Rollout Photography of Maya Vases*, (Figure 3), 349–359.
- Taillandier, P., Ramon Portugal, F., Fuster, A., & Strehaiano, P. (2007). Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. *Food Microbiology*, 24, 95–100. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.002>
- Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 20(2), 255–258. [http://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00091-6](http://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00091-6)
- Toussaint-Samat, M. (2009). *A history of food* (2nd ed.). Paris: Wiley-Blackwell.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., & Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 237–243. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.004>
- United States Agency for International Development. (2012). *The world market for honey*. Retrieved from <http://www.ethiopia-ciafs.org/market-info.aspx>
- Vidrih, R., & Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, 36(2), 151–162. <http://doi.org/10.1556/AAlim.36.2007.2.2>
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction engineering principles* (3rd ed.). Springer. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-9688-6>
- Vit, P., Pedro, S. R. M., & Roubik, D. W. (2013). *Pot-Honey. A legacy of stingless bees* (First). New York: Springer.
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J., & Zhao, G. (2004). Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(4), 340–346.
- Wang, Y., & Liu, S. (2014). Kinetic modeling of ethanol batch fermentation by *Escherichia coli* FBWHR using hot-water sugar maple wood extract hydrolyzate as substrate. *Energies*, 7(12), 8411–8426. <http://doi.org/10.3390/en7128411>
- Yalcin, S. K., & Ozbas, Z. Y. (2008). Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 325–332. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200024>
- Zuluaga, C. M., Díaz Moreno, C., & Quizacán, M. C. (2011). Quimiometría aplicada a la diferenciación por origen de productos de las abejas. *Alimentos Hoy*, 20(24), 23–46.