UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

"Obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

JINMER BRAVO APAZA

Abancay, Abril de 2011

PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC

CÓDIGO	MFN
T IAG B 2011	
	BIBLIOTECA CENTRAL

FECHA DE INGRESO: 28 MAR 2012

Nº DE INGRESO: 00239

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

El jurado calificador da constancia que el presente trabajo de tesis presentado por Br. Jinmer Bravo Apaza.

"Obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen"

Fue sustentado y aprobado en la Fecha 07 de Abril del 2011.

Blgo. Trifon Oros Huayhua	Mgt. J. Silver Barreto Carbajal
Presidente	1° Miembro del Jurado
Ing. Ricardo Paredes Quiroz	Msc. Guadalupe Chaquilla Quilca
2° Miembro del Jurado	Miembro Suplente del Jurado

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

"Obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen"

JINMER BRAVO APAZA

Abancay, Abril de 2011

PERÚ

"Obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen"

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a los seres más importantes de mi vida:

A Dios todo poderoso que es mi guía, mi amparo y fortaleza de mi vida.

A mis padres Toribio Ignacio Bravo Hurtado y Lucia Apaza Nina, a quienes amo con mi alma entera, a ellos por su amor y esfuerzo, a mi única hermana Isabel, la única flor de azucena y de ojos de capulí por su amor, apoyo y motivación en todo momento; a mis hermanos Christian en memoria por su constante presencia espiritual, cuya ausencia no he logrado superar desde su partida, a Heber por el arbotante y afecto fraternal brindado, a mis tíos que me brindaron cariño y demás familiares, a prins por su apoyo, constante ternura y fervor ofrecido.

AGRADECIMIENTO

Con eterna gratitud al alma Mater, la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

A los docentes de la Facultad de Ingeniera de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, quienes entendieron lo que es ser Maestro e imparten su conocimiento, con gratitud a ellos.

Al magister Víctor Hugo Sarmiento Casavilca, por su asesoramiento en todo momento de desarrollo de la investigación y en la culminación del presente trabajo.

Al Ingeniero Víctor Justiniano Huamaní Meléndez por su asesoramiento, apoyo con material didáctico y amistad brindada a pesar de la distancia.

Al Doctor Waldir Desiderio Estela Escalante, por el temple y sabia idoneidad compartida en los inicios de la investigación.

A mis grandes amigos, Fredy Farfán, Luis Valencia, Juan Cerro, por compartir momentos de estudio y recreo.

A mis compañeros de laboratorio Lucio, Jorge, Anderson, Joseantonio y todos mis amigos de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial con quienes he compartido gratas experiencias y también bretes en nuestro diario vivir.

A los miembros del comité Dictaminante: Biólogo Trifon Oros, Ingeniero Ricardo Paredes, Magister Silber Barreto, por los consejos y apoyo en perfilar de esta investigación.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	pág.
Resumen	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEORICO	16
2.1. MIEL DE ABEJAS	16
2.1.1. Definición	16
2.1.2. Composición química	16
2.1.3. Propiedades físicas	18
2.1.4. Levaduras y enzimas en polen y miel de abeja	20
2.1.5. Clasificación de la miel de abeja	21
2.1.6. Usos	22
2.2. MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN	23
2.2.1. Generalidades	23
2.2.2. Características fisiológicas que influyen en el crecimiento de levaduras	25
2.2.3. Criterios básicos de selección y clasificación de levaduras	26
2.2.4. Aislamiento e identificación de levaduras	28
2.2.5. Características morfológicas de levaduras	28
2.2.6. Características fisiológicas de levaduras	29
2.2.6.1. Metabolismo de azucares por levaduras	29
2.2.6.2. Tolerancia al etanol y metabisulfito	29
2.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	30
2.3.1. Generalidades	30
2.3.2. Ciclo bioquímico del proceso	32
2.3.3. Factores que afectan el proceso de fermentación	33
2.4. HIDROMIEL	36
2.4.1. Definición	36
2.4.2. Miel a utilizar	37
2.4.3. Levaduras	38
2.4.4. Técnica de elaboración	39
2.4.5. Envases de de fermentación	40
2.4.6. Preparación de inoculo	40
2.4.7. Preparación del mosto	41
2.4.8. Tratamiento térmico al mosto	43
2.4.9. Fermentación y aditivo químico	43
2.4.10. Clarificado	44
2.4.11. Envejecimiento	45
2.4.12. Envasado	46
2.4.13. Análisis sensorial	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. MATERIALES Y EQUIPOS	48
3.1.1. Materia prima	48
3.1.2. Levaduras	48

3.1.3. Reactivos 48
3.1.4. Medio de cultivo 48
3.1.5. Aditivos 49
3.1.6. Equipos 49
3.2. METODOLOGÍA 49
3.2.1. Materia prima 49
3.2.1.1. Composición química proximal de la miel de abeja 49
3.2.1.2. Características fisicoquímicas de la miel de abeja 50
3.2.2. Aislamiento e identificación de levaduras 50
3.2.2.1. Aislamiento de levaduras 50
3.2.2.2. Mantenimiento de levaduras 51
3.2.2.3. Identificación de levaduras 51
3.2.2.3.1. Estudio morfológico 52
3.2.2.3.2. Estudio fisiológico 52
3.2.2.4. Estudio de fermentabilidad en mosto de miel 54
3.2.3. Preparación del inoculo 55
3.2.4. Preparación del mosto 55
3.2.5. Inoculación y fermentación 56
3.2.6. Clarificación 57
3.2.7. Envasado 58
3.2.8. Evaluación de la calidad de la hidromiel 58
Evaluación fisicoquímica 58
Evaluación sensorial 58
3.2.9. Diseño experimental 59
3.2.10. Análisis estadístico 59
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES 60
4.1.Composición fisicoquímica de la miel de abeja 60
4.1.1. Estudio morfológico 64
4.1.2. Estudio fisiológico 65
4.1.2.1. Tolerancia al metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$) 65
4.1.2.2. Fermentabilidad de azucares 66
4.1.2.3. Tolerancia al etanol 67
4.1.2.4. Tolerancia al acido acético 69
4.1.2.5. Producción de etanol 70
4.1.2.6. Sedimentación y producción de espuma 71
4.1.3. Obtención de hidromiel con cepa seleccionada 73
4.1.3.1. Controles iniciales al mosto 73
4.1.3.2. Variación de los grados Brix y pH durante la fermentación 73
4.1.3.3. Controles al producto final 75
4.1.3.4. Análisis estadístico 77
CONCLUSIONES 89
RECOMENDACIONES 90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91
ANEXOS 94

CONTENIDO DE TABLAS

	Pág.
Tabal 01. Composición de la miel de abeja	17
Tabla 02. Características deseables y no deseables en selección de levaduras	27
Tabla 03. Características a nivel fisicoquímico de la miel	
Tabla 04. Cepas de levaduras aisladas del nicho de la miel	63
Tabla 05. Evaluación de la tolerancia al metabisulfito de sodio	65
Tabla 06. Capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas	66
Tabla 07. Evaluación de tolerancia al etanol por cepas aisladas	68
Tabla 08. Evaluación de tolerancia al ácido acético por cepas aisladas	69
Tabla 09. Evaluación de producción de etanol por cepas aisladas	71
Tabla 10. Sedimentación y formación de espuma por cepas aisladas	72
Tabla 11. Variación de ° Brix y pH durante la fermentación de la hidromiel	73
Tabla 12. Análisis fisicoquímico al hidromiel	76
Tabla 13. Análisis de varianza para etanol	77
Tabla 14. Análisis de varianza para Acidez	78
Tabla 15. Análisis de varianza para pH	79
Tabla 16. Influencia de la temperatura y polen	81
Tabla 17. Efectos estimados para Etanol	93
Tabla 18. Coeficiente de regresión para Etanol	93
Tabla 19. Resultados de la Estimación para Etanol	93
Tabla 20. Respuesta Optimizada	94
Tabla 21. Efectos estimados para Acidez	94
Tabla 22. Coeficiente de regresión para Acidez	94
Figura 23. Resultados de la Estimación para Acidez	94
Figura 24. Respuesta Optimizada	95
Figura 25. Efectos estimados para pH	95
Figura 26. Coeficiente de regresión para pH	95
Figura 27. Resultados de la Estimación para pH	95
Figura 28. Respuesta Optimizada	95
Tabla 29. Anova de un factor para atributos sensoriales	96
Tabla 30. Prueba de homogeneidad de varianza	98
Tabla 31. Anova de atributos sensoriales	99
Tabla 32. prueba post hoc	100
Tabla 33. Subconjuntos homogéneos de atributos sensoriales	104

CONTENIDO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Colonias de levaduras en placas petri	64
Figura 02. Colonia de levaduras de la dilución 10^{-3}	64
Figura 03. Fermentabilidad en azucares por cepas aisladas	67
Figura 04. Tolerancia al acido acético por cepas aisladas	70
Figura 05. Variación de grados Brix y pH con respecto al tiempo	74
Figura 06. Variación de grados Brix y pH con respecto al tiempo	74
Figura 07. Grafico de Pareto para Etanol	78
Figura 08. Grafico de Pareto para Acidez	79
Figura 09. Grafico de Pareto para pH	81
Figura 10. Efecto de temperatura y polen en el análisis sensorial de la hidromiel	83
Figura 11. Media de la intensidad del color amarillo	84
Figura 12. media de la intensidad de aroma / bouquet	85
Figura 13. Media de la intensidad de sabor agrio	85
Figura 14. media de la intensidad de sabor a levadura	86
Figura 15. media de la intensidad de sabor alcohólico	86
Figura 16. media de la intensidad de sabor a miel de abeja	87
Figura 17. media de la intensidad de sabor a polen	87
Figura 18. media de la intensidad de aceptabilidad general	88
Figura 19. Anova de un factor para atributos sensoriales	96

CONTENIDO DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01. Análisis estadístico del hidromiel	94
Anexo 02. Análisis estadístico para evaluación sensorial	97
Anexo 03. Diagrama de bloques para elaboración de hidromiel	107
Anexo 04. Norma técnica Peruana de vinos	108
Anexo 05. Determinación de azucares	109
Anexo 06. Determinación de humedad de la miel	110
Anexo 07. Determinación de acidez de la miel	111
Anexo 08. Determinación de índice de diastasa	112
Anexo 09. Determinación de hidroximetil furfural	113
Anexo 10. Evaluación sensorial de la hidromiel	114
Anexo 11. Panel fotográfico en desarrollo de la tesis	115

Resumen

La Hidromiel es una bebida tradicional que resulta de la fermentación alcohólica de miel de abeja por acción de las levaduras del género *Saccharomyces,* sin embargo cuando la producción es de manera tradicional o artesanal existen varios problemas en el proceso productivo, tal es el caso de la producción en la Región Apurímac, las bodegas productoras producen hidromiel con características fisicoquímicas y sensoriales variadas por acción propiamente de levaduras, y no existe uniformidad en el producto final, además estos problemas están asociados usualmente a la incapacidad de las levaduras del genero *saccharomyces* a adaptarse y fermentar en un mosto de miel de abeja; el objetivo principal de este trabajo es obtener hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen, las cepas aisladas del nicho de la miel se sometieron a evaluación morfológica, luego fisiológica, en la evaluación fisiológica se evaluaron fermentabilidad de azucares, tolerancia al metabisulfito, tolerancia al etanol y pruebas de crecimiento en mosto de miel, posterior a la selección y clasificación se utilizo la cepa aislada con mejores características morfológicas y fisiológicas que mejor se adapten al mosto de miel, para obtener hidromiel manejando dos factores de entrada y cada factor con dos niveles y son: temperatura (20°C, 30°); adición de polen (0,10%, 0,20%), así mismo se evaluaron la influencia de la temperatura y adición del polen en la producción de etanol, acidez total, pH y características sensoriales; se observo estadísticamente que la temperatura seguido del polen tienen influencia significativa en la producción de etanol y pH, la muestra que tuvo mayor aceptabilidad fue hidromiel obtenida a 20°C con 0,10% de adición de polen.

Abstract

The Mead is a traditional drink that results from the alcoholic fermentation of honey of bee for action of the yeasts of the kind *Saccharomyces,* however when production is of traditional or craft way several problems in the productive process exist, such is the case of the production in the Región Apurímac, the productive warehouses produce hidromiel with physicochemical and sensorial characteristics varied by action properly of yeasts, and uniformity in the final product does not exist, besides these problems are correlated usually to the incapacity of the yeasts of the kind *saccharomyces* to become adapted and to ferment in a must of honey of bee; the principal objective of this work is to get mead for alcoholic fermentation from bee's honey with a native yeast *Saccharomyces sp* and addition of pollen, the yeast isolated of the niche of honey submitted to morphologic evaluation, next physiological, in the physiological evaluation they evaluated to the ethanol and proofs of growth in must of honey fermentability of sugars, tolerance to the meta-bisulfite, tolerance, posterior to the selection and classification himself utilize the yeast native isolated with better morphologic and physiological characteristics that better they become adapted to the grape juice of honey, to obtain mead managing two entrance factors and each factor with two levels: temperature (20° C, 30° C); addition of pollen (0,10 %, 0,20 %), likewise they evaluated the influence of temperature and addition of the pollen in the production of ethanol, total acidity, pH and sensorial characteristics; himself notice statistically that significant influence in the production of ethanol and pH that had bigger acceptability, the sign have the temperature followed of pollen he was mead once pollen was gotten from to 20° C with 0.10 % of addition.

1. INTRODUCCIÓN

La Hidromiel es una bebida tradicional que resulta de la fermentación alcohólica del mosto de miel de abeja, la producción de hidromiel es un proceso que conlleva varias semanas y la buena fermentación depende de varios factores, especialmente de la calidad de miel, cepa de levadura, nutrientes que existen en el mosto de miel de abeja, la miel es un producto natural compuesta principalmente por una mezcla de carbohidratos y otras sustancias menores, ácidos orgánicos, proteínas, minerales y vitaminas, pero en buena medida es predominante la fructuosa y la glucosa, estos dos azucares representan el 85 a 95% del total de los carbohidratos de la miel, sin embargo la composición de la miel de abeja es variada, básicamente depende de la fuente floral, además, los factores externos juegan un rol importante como las estaciones del año, condiciones medioambientales.

La producción de hidromiel es una actividad económica de importancia en los valles interandinos de la región Apurímac, en especial la provincia de Andahuaylas de donde proviene la mayor oferta regional de hidromiel. Sin embargo, los productores vienen enfrentando problemas relacionados con la calidad del producto, reflejada en la poca uniformidad del producto final dificultando el ingreso y posicionamiento del producto en el mercado. Este problema está ligado básicamente a las condiciones de fermentación produciendo hidromiel con características fisicoquímicas y sensoriales poco uniformes.

La obtención de hidromiel es un proceso biotecnológico que depende también de la calidad de la materia prima y nutrientes adicionados en proporción adecuada para la buena supervivencia de levaduras; una simple dilución en cantidad igual de agua puede ser suficiente para fermentar, por esta razón las mieles expuestas al aire húmedo fermentan espontáneamente, sin embargo si se quiere satisfacer las necesidades de las levaduras para una buena fermentación es necesario saber las exigencias nutricionales, siendo su principal alimento el azúcar, minerales y nitrógeno.

Por lo anteriormente descrito el presente trabajo de investigación tiene como

Objetivo principal:

Determinar las características fisicoquímicas y sensoriales aceptables en la obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja con una cepa nativa *Saccharomyces sp* y adición de polen.

Como objetivos específicos:

1. Caracterizar a nivel fisicoquímico la miel de abeja.
2. Aislar y caracterizar cepas de levaduras nativas *Saccharomyces sp* del nicho natural de la miel de abeja.
3. Evaluar la influencia de la temperatura de fermentación en las características fisicoquímicas y sensoriales de la hidromiel.
4. Evaluar la influencia de adición de polen en las características fisicoquímicas y sensoriales de la hidromiel.

Se plantea las siguientes hipótesis:

1. El uso de la cepa de levadura *Saccharomyces sp* en la obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja, produce hidromiel con características fisicoquímicas y sensoriales aceptables.

2. Los parámetros tecnológicos de fermentación en la obtención de hidromiel, temperatura y adición de polen, influye en las características sensoriales y fisicoquímicas del producto.

Para el desarrollo de la investigación se tomó como antecedentes bibliográficos de autores nacionales e internacionales:

Resurrección, (1988) desarrolló la investigación "Factibilidad técnica de elaboración de hidromiel" investigación desarrollada en la Universidad Nacional Agraria La Molina – Lima Perú, donde el autor manipula en la elaboración de hidromiel factores como cepas de levadura

(*Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomyces uvarum*, levadura de pan, levadura de vino de las borras) donde resultó ser el mejor que se adapto al mosto de miel la levadura *Saccharomyces ellipsoideus*, además trabajó con el segundo factor que es el pH (2.3;2.6;2.9;3.25; 3.6; y 3.9) resultando ser el mejor 3.6, también se evaluó la adición de fosfato de ácido de amonio, resultó ser mejor 0.2g por litro; se llegaron también a conclusiones que el acido de amonio incrementa la velocidad de fermentación en los primeros días.

Roldán (2010) realizó la investigación "Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics", realizado en el departamento de ingeniería Química y tecnología de alimentos en la Universidad de Cádiz – España; evaluó la concentración de polen en la preparación del mosto de miel, donde evaluó 10 g/litro y 50g/litro, resultaron que la adición de polen tienen una influencia significativa en la composición de compuestos volátiles y en las características sensoriales de la hidromiel, las dosis adecuadas de polen fue determinada por las características finales y perfil sensorial de la hidromiel, concluye que 12g/hectolitro de polen es el más apropiado, el polen es buen activador de la fermentación, pero a nivel industrial usar en cantidad inferior.

Pérez (1996) desarrolló la investigación "Obtención de Hidromiel Utilizando Células Inmovilizadas *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126", evaluó temperaturas de fermentación de 25 °C, 30 °C y 35 °C, resultó mejor la fermentación a 30 °C con un rendimiento de etanol de 0.539. Además se evaluaron distintos pH 3, 3; 5, 4 y 4.5, resultando ser mejor pH de 4. También se evaluó distintos clarificantes como alginatos, clara de huevo y taninos enológicos, resultó ser mejor clarificante el tanino enológico en una concentración 0.08 g/litro.

2. MARCO TEORICO

2.1. MIEL DE ABEJAS

2.1.1. Definición

Es la sustancia dulce producida por las abejas obreras (principalmente *Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias especificas y almacenan en los panales (ITINTEC, 1980), además la miel es un fluido dulce y viscoso, recogido de los nectarios de las flores y transformado en alimento por varias especies de insectos, especialmente por las abejas (*Apis melliferara*), la miel es el néctar obtenido de las flores por las abejas obreras, que luego es transformado en el buche o estomago y almacenado en los panales para que sirva como alimento a las crías (Root, 1974)

2.1.2. Composición química

En cuanto a la composición de la miel de abeja no todas tienen la misma composición, estos dependen de la naturaleza de las diversas sustancias azucaradas recogidas por las abejas, en general la miel operculada contiene 25% de agua, gran proporción de glucosas o azucares de fruta y pequeñas cantidades de dextrina (Layens, 2008), Con respecto a los grados Brix Pérez (1996) reporta 84°Brix a 20°C; además de presentar glúcidos como la fructuosa, glucosa y otros azucares, la miel de abeja presenta compuestos de actividad antioxidante, compuestos volátiles del sabor propio de la miel, como los terpenos, fenoles, limoneno que posiblemente sea el origen las flores de los cítricos; el promedio encontrado de siete muestras analizadas son: humedad 21,3 g/100g, mientras tanto la fructuosa con 42,2 g/100g, glucosa 31,11 g/100g, sacarosa con 1,185 g/100g y Hidroximetil Furfural 2064.7 mg/kg y el total de poli fenoles 2300.44 mg/100g. (Jerkovic, *et. al.* 2010); además

la ITINTEC (1980) establece que la miel de abeja natural deberá tener como mínimo 65% de azucares, como máximo 21% de humedad, como valor máximo 0,6% de minerales (ceniza).

Tabla 01. Composición general de la miel de abeja

Principales componentes	%
1.- Humedad	17,20
2.- Azucares • Lebulosa (fructuosa).....38,19 • Dextrosa (glucosa).....31,28 • Sacarosa.....01,31 • Maltosa.....07,31 • Otros azucares.....01,50 Total de azucares.....79,59	79.59
3.- Ácidos (Glucónico, Cítrico, Málico, Succínico, Fórmico, Acético, Butírico, láctico, pirogluconico, y aminoácidos) Total de ácidos calculados: • Acido glucónico.....0,57 • Proteínas (nitrógeno 0,0416 x 6,25).....0,26 • Cenizas (minerales, potasio, sodio, calcio, sulfato, magnesio, Fosfato, etc.).....0,17 **Total de ácidos, proteínas y cenizas 1,00**	
4.- Otros componentes • Pigmentos (carotenos, clorofila, xantofila. • Sustancias aromáticas y saborizantes (terpenos, aldehídos, alcoholes, esteres, etc.) • Taninos • Enzimas (invertasa, diastasas, oxidasa, catalasa, fosfatasa) • Vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina k, acido fólico)	2,21
TOTAL	100,0

Fuente: Prost (2006)

2.1.3. Propiedades físicas

La miel se caracteriza por el sabor y el color además por la rapidez del poder de solidificación formando cristales muy finos o gruesos, es así que la miel de la flor de naranjas, limón, mandarinas presentan un color blanco, se cristaliza muy lento pero al cristalizarse es demasiada compacta, mientras que la miel de alfalfa posee un color ámbar claro con un olor bastante intenso y sabor fuerte raspa la garganta al ingerir, la miel de eucalipto posee un color ámbar claro sabor a eucalipto, se cristaliza de manera rápida formando cristales gruesos y se disuelve con facilidad, y la miel de girasol es de color amarillo intenso con una rápida cristalización, posee alto porcentaje de glucosa, características particulares de miel influirán en la elaboración de la hidromiel así como el sabor y color (Ricciardelli, 1989); también la miel presenta una densidad comprendida entre 1,410 g/cc. y 1,435g/cc. Varían considerablemente con su tenor de humedad (Prost, 2006); el resultado obtenido por Resurrección (1988) es 1,4225 g/cc. Mientras tanto ITINTEC (1980) reporta una densidad mínima a 20° C 1,37 g/cc., Pérez (1996) reportó 1,42g/cc.

Color.- El color de la miel puede ser claro, ámbar pálido, ámbar oscuro, por lo general la miel más clara es delicada o de sabor suave, inversamente la miel más oscura es de sabor fuerte y pronunciado, el color de las mieles dependerán básicamente de la procedencia de los néctares, el tipo de planta (Root, 1974).

Acidez total.- Los ácidos málico, cítrico, se encuentran en mayoría de mieles, también el acido fórmico dentro de ellos, en muy pequeña proporción, encontraron valores de 0,348% como máximo y 0,052% como mínimo (Rinaldi, 1971), mientras

tanto ITINTEC (1980) señala 4.00 como máximo, además Pérez (1996) reportó 3,4 expresado en meq/kg.

pH.- Varían corrientemente entre 3,6 y 4,2, en casos de extremos oscilan entre 3,2 y 4,9 (Rinaldi, 1971); mientras tanto Resurrección (1988) señala que el pH encontrado es de 3,93, además Pérez (1996) obtuvo un resultado de 4,18.

HMF (Hidroximetil Furfural).- El Hidroximetil Furfural se produce por tratamientos térmicos de la miel, es el indicador del grado de frescura, en general las mieles contienen entre valores de 40 mg/kg y 80 mg/kg, dependiendo del clima de donde procede la miel, una vez depositada la miel en los panales ocurre un envejecimiento natural (Prost, 2006) Mientras tanto Resurrección (1988) señala un valor de 40mg/kg de miel de abeja.

Índice diastásico.- La diastasa permite establecer el grado de frescura y autenticidad de una miel, el empleo de enzimas del tipo amilasas por parte de las abejas durante el procesamiento del néctar, constituye pequeñas concentraciones en la miel, existen mieles hasta con 3,0 de índice de diastasa; según la norma técnica de ITINTEC (1980) establece que es la cantidad, en centímetros cúbicos, de una solución de almidón al 1% hidrolizada en una hora por la enzima contenida en 01 g de miel, al índice diastásico también se le conoce como actividad o poder diastásico, además Resurrección (1988) determinó 8.0 de índice diastásico.

Componentes del sabor.- El sabor constituido por aceites esenciales, esteres como el "metil antranilato" son volátiles, se elimina fácilmente cuando se calienta la miel,

los aceites esenciales componentes de la fragancia de las flores y de las plantas dan a la miel el aroma y sabor (Root, 1974).

2.1.4. Levaduras y enzimas en polen y miel de abeja

El polen es considerado suplemento dietario ya que podría reemplazar los alimentos ricos nutritivamente, posee las vitaminas que el ser humano necesita, presenta alto contenido de aminoácidos esenciales hasta el 25% de su peso en proteína, minerales, enzimas con actividad terapéutica, en la composición del polen se encuentra una alta cantidad de minerales, aminoácidos, vitaminas, hidratos de carbono, grasas en pequeña proporción, en cuanto a la composición de minerales destacan el calcio y hierro orgánico, son fácil de absorción y asimilación para el organismo, respecto a los aminoácidos el polen es uno de los pocos vegetales que contienen los diez aminoácidos esenciales (Díaz, 2004), El polen almacenado en la colmena contiene de 7 a 30 % de proteínas, grasas minerales, vitaminas y otros, es la única fuente natural de materia nitrogenada para las abejas, por tanto se utiliza en la elaboración de hidromiel (Prost, 2006).

El elevado contenido de azúcar de la miel, es capaz de impedir el desarrollo y crecimiento de levaduras, sin embargo existe levaduras que podrían sobrevivir en altas concentraciones de azucares denominados azúcar – tolerantes, tal es las levaduras del genero *"Zigosaccharomyces"* y el que predomina en las mieles almacenadas es *"Z. richteri"*, la causa principal de la alteración de la miel son las levaduras osmófilas, además existen enzimas sensibles al calor como las diastasas, amilasas, invertasas, a 10°C podría conservarse por años, mientras a 20°C solo de 2 a 5 años, Las amilasas se encargan sobre la digestión del almidón se encuentran en todas las mieles, mientras que las invertasas son responsables de la transformación

de la sacarosa del néctar que todavía no ha sido invertido, esta enzima no actúa si la miel a sido calentado puesto que el incremento de temperatura destruye su acción, la invertasa se encuentra tanto en el organismo de las abejas como también en la miel (Root, 1974).

La existencia de microorganismos en la miel de abeja esta relacionado con factores como humedad y condiciones de temperatura, el polen es fuente portadora de levaduras, los microorganismos en la miel pueden influenciar en la calidad o seguridad de la miel, la presencia de microorganismos también esta relacionado con la buenas practicas en la cosecha de la miel, además el contacto con el aire, polvo, tierra, néctar que son fuentes que es difícil de controlar, generalmente se encuentran en la miel de abeja levaduras osmotolerantes como *Torulopsis spp, Saccharomyces, Pichia spp, Rhodotorula spp, Schizosaccharomyces, Zigosaccharomyce,* por debajo de 100 colonias de formadoras por gramo (ufc/g)., y bacterias del genero *Bacillo,* esporas de C. *botulinum* en niveles mínimos, las bacterias no se reproducen en la miel, pero si pueden sobrevivir en la miel en temperaturas frescas, la miel contiene antimicrobianos como agua oxigenada que aminora la proliferación de microorganismos. Las levaduras pueden crecer bajo las condiciones acídicas y no pueden estar inhibidas por sacarosa, son osmofílicos o azúcar tolerantes las que pueden fermentar con facilidad la miel (Snowdon, 1996).

2.1.5. Clasificación de la miel de abeja

ITINTEC (1980) la miel de abeja clasifica por su origen, por su forma de obtención o elaboración, por su estado físico y por su color:

Por su origen

- Miel de flores
- Miel de mielada

Por su elaboración

- Miel de panal
- Miel centrifugada
- Miel prensada

Por su estado físico

- Miel liquida
- Miel parcialmente cristalizada
- Miel licuada
- Miel batida

Por su color

- Miel blanca agua
- Miel extra blanca
- Miel blanca
- Miel ámbar extra clara
- Miel ámbar clara
- Miel ámbar
- Miel ámbar oscuro

2.1.6. Usos

La miel es un alimento natural, un producto dietético y un medicamento incluso, en cuanto a sus propiedades medicinales la miel permite luchar contra los trastornos intestinales, las ulceras del estomago, el insomnio, los males de garganta, ciertas

afecciones cardiacas, aumenta el contenido de hemoglobina en la sangre y el vigor muscular; en los niños facilita la retención del calcio, activa la osificación y la salida de los dientes, es ligeramente laxante, además de usarse como alimento la miel se usa en el campo farmacéutico, jarabes de miel, para diluir y conservar la jalea real, en la fabricación de hidromiel (Prost, 2006), también el uso de la miel hoy en día es muy diversificado, es más consumido en su estado natural, es decir como miel liquida, cristalizada o en panal, además es utilizado en la medicina, es utilizado como ingredientes en las recetas para diversas comidas en los países industrializados como Europa, América del Norte, además utilizan para elaborar cerveza, dulces, la miel es consumida algunas veces añadiendo polen, también en África utilizan como ingrediente de las comidas, para los productos asados al horno, en la industria de cereales para el desayuno, en la preparación de mermeladas, en Italia utilizan con frutas enteras secas en miel como la piña, los higos (FAO, 1996).

2.2. MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN

2.2.1. Generalidades de las levaduras

Aunque el hombre ha fabricado bebidas fermentadas desde tiempos inmemoriales el rol de las levaduras en la fermentación alcohólica fue claramente establecida a mediados del siglo XX, Charles Cagnard demostró que el proceso de fermentación puede ser detenido por tratamientos térmicos o con aditivos químicos, y fue Luis Pasteur quien acredito definitivamente la fermentación alcohólica por levaduras (Ribéreau, 2003), taxonómicamente las levaduras son eucariotas unicelulares y se producen por gemación, las levaduras por su modo de reproducción se encuentran dentro de los ascomicetos (Ribéreau, 2003), la pared celular constituido por

glucanos que son insolubles en agua y las monoproteínas, tiene por función asegurar la protección y alojar a enzimas como la invertasa o B – fructofuranosidasa, que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa y otras enzimas como melibiosa, trihalosa, aminopeptidasa, esterasa, la membrana plasmática es una barrera altamente selectiva que controla los intercambios entre células vivas y el medio exterior, esta constituido por lípidos y proteínas, el principal esterol es el ergosterol y otros como el zimosterol; por su sistema de permeasas la membrana plasmática controla los intercambios entre célula y medio, además en el citoplasma existen sistemas de transportadores de los azucares, existen dos tipos de transportadores, una es con alta afinidad a la glucosa, y otra con una afinidad de 10 veces menor, el tenor de esteroles de las membranas particularmente ergosterol, favorece la penetración de la glucosa en la célula sobre todo durante la fase estacionaria, dicho fenómeno explica la influencia determinante de la aireación durante la fase de multiplicación, las organitas como el citosol ubicada en la membrana plasmática es una solución tamponada de pH 5 a 6 que contiene enzimas, estas enzimas son de la glicólisis y la fermentación alcohólica (Ribéreau, 2003). La Microbiología Enológica tiene su origen en los estudios de Louis Pasteur, quien demostró que las levaduras eran las responsables de las fermentaciones alcohólicas del mosto, desde entonces la Microbiología de la vinificación ha sido extensamente estudiada y en consecuencia se ha revelado la gran complejidad de la Ecología de las fermentaciones, la fermentación de los mostos es un proceso en donde pueden intervenir diversas especies de levaduras, las levaduras del vino son ascomicetos (Esporógenas) y deuteromycetes (no esporogenas) (Regodón, 2003).

Las levaduras que proceden de zonas donde se van ha utilizar son más efectivas, aunque existen levaduras comerciales para realizar las fermentaciones, las levaduras locales seleccionadas conocidas como cultivos puros, se han utilizado con excelentes resultados obteniéndose productos finales de calidad más uniforme, las levaduras de la zona son adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, adaptadas a la materia prima, responsables parcialmente de las características únicas de los vinos obtenidos; seleccionar la cepa de levadura para cada tipo de fermentación es una estrategia para garantizar una fermentación correcta, así como para mejorar las características del vino final (Mas, Torija, et al. 2006).

Las levaduras son microorganismos que transforman el azúcar del mosto en alcohol etílico y compuestos secundarios, por tanto son agentes biológicos de la vinificación, además las levaduras son responsables de las características de sabor, aromas en las bebidas fermentadas, conjuntamente con otros factores como la temperatura, pH concentración de sustrato en el mosto, estos factores también afectan la producción de etanol y otros alcoholes (Gastoni, 2005).

2.2.2. Características fisiológicas que influyen en el crecimiento de levaduras

Los azucares son los mejores alimentos energéticos de las levaduras, los alimentos nitrogenados utilizados varían desde compuestos tan simples como el amoniaco y urea hasta aminoácidos y péptidos, las levaduras además necesitan de factores suplementarios de crecimiento como vitaminas, minerales, presencia de oxigeno.

En cuanto a las características fisiológicas, distintos tipos de levaduras difieran considerablemente en su fisiología, pero las de importancia industrial tienen suficientes caracteres fisiológicos comunes lo que permite generalizaciones con tal que se tengan presentes que existen excepciones.

La temperatura de crecimiento de las levaduras, es en general semejante al de los mohos, se desarrollan mejor a 25 °C – 30 °C. y un máximo de 35 – 47° C. algunos tipos pueden crecer a temperatura de 0° C ó inferiores, el crecimiento de la mayoría de las levaduras, se ve favorecido, a un pH acido próximo a 4.0 a 4.5, no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado, crecen mejor en condiciones aerobias, las fermentaciones pueden hacerlo mejor en condiciones anaerobias (Mendoza, 1987; Muller, 1991).

2.2.3. Criterios técnicos de selección y clasificación de levaduras

Para conseguir nuevos cultivos iniciadores que posean buenas características fermentativas, existen diversas técnicas encaminas a la selección y clasificación de levaduras enológicas, así como la selección clonal, que consiste aislar cepas de una amplia población de cepas autóctonas y analizar a nivel de laboratorio. Antes de seleccionar levaduras de una determinada zona, se tiene que hacer un estudio de reconocimiento de flora autóctona, se confirma o no la presencia de levaduras que llevan acabo la fermentación alcohólica espontánea (Mas, Torija, et al. 2006).

Cuando se trata de seleccionar levaduras de una zona se tiene que tener ciertos criterios básicos como las características deseables y no deseables en la selección de levaduras.

Tabla 02. Características deseables y no deseables en selección de levaduras

Características deseables	**Características no deseables**
Alta tolerancia al etanol	Producción de SO_2
Total degradación de los azucares fermentables	Producción de H_2S
Resistencia al sulfito SO_2	Producción de acidez volátil
Capacidad fermentativa a bajas temperaturas	Producción de acetaldehído y piruvato
Máxima reducción de la fase de latencia	Producción de espuma
Capacidad fermentativa a altas presiones	Producción de poli fenoles oxidasa
Producción de glicerol	

Fuente: Mas *et al.* (2006)

La clasificación de las levaduras gracias al avance de la ciencia, desarrolló nuevas técnicas clasificatorias basadas en la biología molecular, así como el análisis de secuencia de ADN ha permitido superar o reagrupar las especies de levaduras.

En la clasificación de las levaduras, su morfología es una de las características a tener en cuenta, lo son también su forma de reproducción y características bioquímicas como el tipo de azucares que puede fermentar, el rendimiento en alcohol, productos secundarios de la fermentación, resistencia al anhídrido sulfuroso y capacidad para asimilar distintas sustancias nitrogenadas (Mesas y Alegre, 1999).

Las levaduras son hongos unicelulares, la mayoría pertenece al genero de los ascomicetos, normalmente son ovales, esféricas o casi cilíndricas (Madigan, Martinco y Parker).

Las levaduras pertenecen al reino Fungí y dentro de ella a la división Eumicota, dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos, la ascomytina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, los deuteromycotina representada por levaduras incapaces de

formar esporas llamas por ello no esporógenas, los géneros de levaduras esporógenas, englobados en la familia *Saccharomycetacea*, se distribuyen en tres subfamilias, las levaduras no esporógenas constituyen las familia *Cryptococcaceae*, las levaduras pueden ser clasificadas en sub especies y variedades que a menudo adquieren el rango de especies tras nuevas revisiones taxonómicas (Mesas y Alegre, 1999).

2.2.4. Aislamiento e identificación de levaduras

El aislamiento y recuento de levaduras se realiza en placas de Petri con medio rico agarizado, se suelen identificar basándose fundamentalmente en características morfológicas y fisiológicas, metabolismo de algunos azucares y asimilación de diversos compuestos nitrogenados, el método propuesto por Krejer es la más utilizada, pero ya comienza a introducirse técnicas moleculares para identificar las levaduras (Regodón, 2003).

2.2.5. Características morfológicas de levaduras

Las levaduras según su genero y especie presentan diferentes formas, pudiendo ser elipsoidales, elípticas esféricas y ovaladas; Las levaduras *Saccharomyces* morfológicamente son esféricas o elipsoidales, con un diámetro aproximado de 8um y las *Saccharomyces cerevisiae* presentan colonias de color crema, mantecosa, lisa, circular y muy prominente, las *Saccharomyces* forman ascas típicas en forma de tétrada, son persistentes y usualmente contienen de 1 a 4 ascosporas, son las levaduras fermentativas por excelencia, principalmente responsables de las fermentaciones de los mostos y que producen en algunos casos (*S. cerevisiea*) niveles de etanol superiores al 18% (v/v). algunas especies pueden crecer mediante metabolismo oxidativo sobre la superficie del vino denominadas levaduras de flor,

dando lugar a la producción de acetaldehídos y otros compuestos secundarios (Regodón, 2003).

2.2.6. Características fisiológicas de levaduras

2.2.6.1. Metabolismo de azucares por levaduras

El metabolismos de los azucares es un proceso bioquímico por la cual las levaduras transforman los azucares del mosto en etanol y CO2 denominada también fermentación alcohólica, para que exista un metabolismo de los azucares por las levaduras, el mosto debe hallarse en condiciones de limitación de oxigeno, en condiciones de aerobiosis las levaduras se multiplican abundantemente formando biomasa y se consigue 1 g de levaduras por cada 4 g de azúcar consumido, en anaerobiosis las levaduras metabolizan los azucares generando etanol, CO2 y energía, el metabolismo de azucares se realiza por un mecanismo bioquímico, secuencia de reacciones enzimáticos, generando además del etanol y CO2 productos secundarios que contribuyen en el sabor, aroma de la bebida fermentada (Mesas y Alegre, 1999).

2.2.6.2. Tolerancia al etanol y metabisulfito

Las cepas de levaduras dependiendo de su genero y especie son tolerantes y productoras de determinadas concentraciones de etanol, de igual manera también son tolerantes al metabisulfito, en razón a ello las especies de mayor relevancia enológica son las levaduras *Saccharomyces Cerevisiae (S. ellipsoideus)* levadura que fermentan mayor parte de los azucares del mosto, su poder alcohológeno es elevado (17°) y es bastante resistente al SO2 (250 mg/l); mientras que *Saccharomyces bayanus (S. oviformes)*. Resiste altas

concentraciones de SO2 (250mg/l) su poder alcohológeno es 18° , denominado levadura de las etapas finales de la fermentación; la *Saccharomyces acidificans (S. baillii)* tiene poder alcohológeno de 10°, su resistencia al SO2 es de 250 a 400 mg/l. le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfatados, comportándose como levadura de primera fase., la *Torulospora rosei (S. rosei)* tiene un poder alcohológeno de 8 a 14° se caracteriza por aparecer al principio de la fermentación alcohólica y produce gran cantidad de compuestos secundarios, mientras que *Kloeckera apiculata*, es la forma imperfecta o haploide de *Hanseniaspora uvarum*, conjuntamente con *S. cerevisiae* son más frecuentemente encontrados en mostos, su poder alcohológeno es de 4 a 5 ° y también es su rendimiento en alcohol 21 a 22g de azúcar/ 1° de alcohol, produce mucha acidez volátil, baja resistencia al sulfito, mientras que la *Candida stellata (Torulopsis stellata)* tiene un poder alcohológeno de 10 a 11° y se caracteriza por aparecer en uvas atacadas por podredumbre (Mesas y Alegre, 1999).

2.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

2.3.1. Generalidades

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO2 Para que la fermentación alcohólica tenga lugar, el mosto ha de hallarse en condiciones de limitación de oxígeno, En condiciones de anaerobiosis las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto ya que se consigue 1 g de levadura por cada 4 g de azúcares consumidos.

En anaerobiosis las levaduras realizan la fermentación alcohólica, es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO2 y energía. En estas condiciones el rendimiento en biomasa es de tan sólo 1 g de levadura por cada 100 g de azúcares consumidos (Mesas y Alegre, 1999). La fermentación siempre se ha comparado con la ebullición, su nombre tiene origen en la palabra latina "Fervere" que significa "hervir", mientras se produzca la fermentación el líquido pierde su sabor azucarado y se vuelve vinoso; Gay Lussac elaboro una formula matemática de la reacción:

Azúcar (100%) = alcohol (51.34%) + gas carbónico (48.16%)

En realidad el fenómeno es más complejo, Pasteur estableció que la ecuación de Gay Lussac es valida para el 90% de azúcar transformado, el resto lo forman otras sustancias: glicerol, acido succínico, acido acético; más tarde se descubrieron otros productos secundarios: acido láctico, butilenglicol, aldehido acético, acido pirúvico, alcoholes superiores y un gran numero de sustancias diversas presentes en cantidades mínimas (Peynaud, 2003), Lavoisier (1787), después Gay Lussac (1820) y Dumas (1840) identificaron los principales productos de la fermentación alcohólica (alcohol etílico, anhídrido carbónico, acido acético) representaron el desdoblamiento de los azucares por la ecuación química:

$$C_6 H_{12} O_6 \longrightarrow 2\, C_2 H_5 OH + 2CO_2$$

En una fermentación alcohólica 100 g. de azucares de uva dan los siguientes resultados:

Alcohol etílico.....48.4 g. ó 61 cm3
Anhídrido carbónico.....46.6 g.
Glicerina.....3.20 g.
Acido succínico.....0.60 g.
Levaduras y otros.....1.30 g.

La descomposición de azúcar en alcohol y gas carbónico es una reacción exotérmica; una molécula de glucosa (180 g.) al quemarse completamente produce 679 calorías (Bremond, 1966), la producción de etanol es directamente proporcional a la velocidad de consumo de azucares fermentecibles totales (Gastoni, 2005).

$$\frac{dP}{dP} = - Y_{p/s}\frac{dS_T}{dt}$$

2.3.2. Ciclo bioquímico del proceso de fermentación

Cuando el proceso de fermentación se lleva acabo por levaduras, sigue el ciclo de Embden - Meyerhof, liberando durante el proceso dos moléculas de ATP por mol de glucosa consumida; dicho ciclo comprende las siguientes reacciones: La primeras etapas de la fermentación consisten en la fosforilación de las hexosas por medio de una enzima hexoquinasa, esta enzima con ayuda de la fosfoglucomutasa y la fosfoglucoisomerasa, produce cuatro azucares fosforilados; glucosa – 6 – fosfato, glucosa – 1 – fosfato, fructosa - 6 – fosfato y fructosa -1,6- difosfato.

La última hexosa fosforilada citada ha adquirido del ATP la cantidad de energía para su fisión en dos triosas, esta fisión es producida por la aldosa, estableciéndose un equilibrio entre las dos triosas. Si la fermentación prosigue sin interferencias internas, el equilibrio se desplaza hacia el 3-fosfogliceraldehido porque esta constantemente oxidándose a acido – 3- fosfoglicerico.

Esta oxidación es catalizada por una deshidrogenasa que contiene DPN (Difosfopiridin Nucleótido como grupo prostético). Otra molécula de fosfato se une en ese instante al acido glicérico y es transferida de nuevo al ADP. Fosfogliceromutasa, a acido 2 fosfoglicerico y pierde una molécula de agua, quedando convertido en acido fosfoenolpirúvico que pierde su molécula de acido

fosfórico, transfiriéndola al ADP, con la que se forma una molécula de ATP que vuelve a entrar en el ciclo. En la próxima etapa se descarboxila la forma ceto del acido pirúvico, perdiendo una molécula de CO2, etapa que es catalizado por la carboxilasa, enzima cuyo grupo prostético esta constituido por la fosfotiamina (Tiamina Fosforilada, vitamina B1)

La descarboxilación deja evidentemente como residuo acetaldehído, que es deshidrogenada por el ADP a alcohol etílico (Murray, 1988)

2.3.3. Factores que afectan el proceso de fermentación

En la fermentación alcohólica existen factores ya sea físico o químico que inciden en la fermentación, actuando sobre el desarrollo de las levaduras ya sea de manera positiva o negativa, los más relevantes son:

La temperatura.- A mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre más rápidamente, sin embargo es menos pura, se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan mejoras en la calidad del vino. Por otro lado las levaduras se desarrollan mejor alrededor de los 30°C, por encima de 35°C la actividad decrece rápidamente y a los 45°C mueren. Por debajo de 10°C, las levaduras silvestres son inactivas (Mesas y Alegre, 1999).

El oxígeno.- Aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado a moléculas del mosto. En caso de carencia de este oxígeno pueden requerirse remontados del mosto con aireación para evitar la parada de fermentación alcohólica (Mesas y Alegre, 1999).

Los nutrientes.- Por un lado están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras, deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la fermentación alcohólica transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras. Sin embargo en casos de vendimias atacadas de podredumbre en las que los mohos han consumido parte de estos nutrientes, puede ser necesario adicionar al mosto complejos vitamínicos y sales de amonio (Mesas y Alegre, 1999).

También los aminoácidos cumplen un papel importante en cuanto al sabor aroma y el gusto de las bebidas, las concentraciones de aminoácidos en las bebidas varían ampliamente, los aminoácidos puede ser un indicador de la calidad de materias primas (Culbertson, Duncan, 2006).

Los compuestos químicos de acción negativa.- Por un lado la acumulación de los propios productos de la fermentación alcohólica pueden ralentizar. Por otro lado, esos mismos compuestos junto a otros presentes en el mosto de forma natural (taninos) o artificial (pesticidas, SO2, etc.) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras (Mesas y Alegre, 1999).

Aminoácidos.- Los aminoácidos juegan un papel importante en la calidad de las bebidas fermentadas como el vino y cerveza, altos niveles de aminoácidos pueden hacer que las bebidas resulten ser inadecuadas para su consumo, concentraciones elevadas de aminoácido favorecerían en la formación de tóxicos en las bebidas, (Culbertson, Duncan, 2006).

Los nutrientes son elementos esenciales en el desarrollo de las levaduras, para la multiplicación y para la fermentación.

El oxigeno.- La fermentación no puede prescindir del oxigeno, cuyo papel en importante en la multiplicación de las levaduras, además juega un papel importante en la síntesis de los esteroles y de ácidos grasos insaturados de largas cadenas carbonadas, las aireaciones son una herramienta poderosa para efectuar una buena fermentación, las aireaciones no presentan ningún riesgo de oxidaciones para los componentes del vino porque el medio es muy reductor (Peynaud, 2003).

Nitrógeno.- Las levaduras necesitan nitrógeno asimilable, constituido de nitrógeno amoniacal y diversos aminoácidos, se deben enriquecer los diversos mostos que contienen menos de 50 mg/lt. de nitrógeno amoniacal, se utiliza para fines de corrección el sulfato de amonio (Peynaud, 2003).

Las vitaminas.- Las levaduras necesitan vitaminas habitualmente presentes en cantidades suficientes en el mosto (Peynaud, 2003).

Las acideces elevadas.- A menudo se menciona como favorables para el buen desarrollo de las fermentaciones alcohólicas pero no tiene efecto positivo directo, porque las levaduras fermentan mejor a pH elevado (Peynaud, 2003).

2.4. HIDROMIEL

2.4.1. Definición

La hidromiel es una bebida alcohólica obtenida de la fermentación del mosto de miel, con la adición de nutrientes, pudiendo alcanzar de 9 % hasta 18% (v/v) de etanol (Sroka *et al.* 2006; Roldan *et al.*2010), la hidromiel es vino de miel de abeja, o néctar de los dioses es la más antigua de las bebidas alcoholizadas, requiere básicamente de miel, agua y levaduras (fermento) además de mucha limpieza y un poco de experiencia (Lorenzen, 1981), La hidromiel, es producto de la combinación de la miel y agua y por acción de las levaduras se observara la producción de gas, la fermentación no tardará en iniciarse, siendo preciso examinar a los tres o cuatro días los fermentadores no haga saltar los tapones o rompa aquellas, una vez pasada los 10 días, se procede a pasar el liquido por un tamiz vertiéndole en un barril que debe quedar casi lleno, el cual se colocara en donde la temperatura sea poco variable es decir constante entre 25 y 30 °C, los efectos fermentecibles vinosos no se harán esperar largo tiempo y continuaran por periodo de un mes. Terminado la fermentación observada que el líquido se ha hecho vinoso, el barril se lleva a otro sitio para conservarlo durante un año, en cuyo tiempo se convierte en una especie de vino muy agradable (Alberti, 2005); En Francia y en particular en el norte, se conoce bajo el nombre de hidromiel una bebida espirituosa que no tiene ninguna de las cualidades propias que distinguen el vino de miel, se ha dado gran numero de formulaciones para la fabricación de la hidromiel, la fuerza alcohólica de un buen hidromiel es ser muy fuerte en alcohol, es decir marcar 15 a 17 °, en efecto los hidromieles fuertes tienen la ventaja de conservarse indefinidamente; al envejecer, puede rivalizar con los mejores vinos y son los más apreciados por los catadores, los hidromieles flojos no tienen estas cualidades, mientras que los hidromieles

fuertes pueden usarse incluso como bebida corriente, mezclando con suficiente cantidad de agua; un buen hidromiel que ha envejecido lo bastante, no conserva sabor alguno que recuerde la miel (Layens *et. Al* 2008), cuando se produce hidromiel en una forma casera, los productores de la hidromiel encuentran varios problemas, como la falta de uniformidad en el producto final, fermentaciones atrasadas y la producción de sabores desagradables por levaduras, las levaduras del genero *Saccharomyces* aisladas de la miel de abeja es apropiado para la producción de hidromieles, sin embargo es de importancia las características de la miel y los suplementos utilizados como nutrientes en la formulación del mosto, La hidromiel bebida tradicional podría contener de 9% hasta 18% (v/v) de etanol, la buena fermentación y la calidad de la hidromiel depende de la calidad de la miel, levadura, los nutrientes, el control de pH, el color y sabor de la hidromiel esta en función del color y la composición de la miel (Pereira, *et. al.* 2009).

2.4.2. Miel a utilizar

La miel Clara u oscura, recién recogida o añeja, no importa de que miel proceda la hidromiel, es más, hay poca relación entre la calidad de la miel y la hidromiel que se obtendrá (Prost, 2006), mientras tanto Resurrección (1988) afirma que se debe utilizar mieles más dulces, aromáticas y de color más claro, mieles que no hayan sufrido calentamiento previo, siendo aconsejable emplear mieles recién extraídos, estas recomendaciones tienen por objeto que la hidromiel tenga un color ámbar pálido y que represente excelente aroma.

La miel de abeja es una materia prima caracterizada por un punto bajo de acidez, para asegurar el pH optimo en la fermentación de hidromiel, se adiciona el acido cítrico, acido tartárico, los ácidos orgánicos forman parte del sub producto de la

fermentación del etanol, los cambios en la concentración de ácidos orgánicos puedan dar lugar una parada en la fermentación alcohólica, entre los acido orgánicos se encuentran el octanoico, decanoico y el acido acético que pude detener incluso el desarrollo de las levaduras , además se observa un incremento rápido en la acidez al inicio de la fermentación, mientras tanto se observa la caída de pH, los hidromieles cuanto más tiempo se tienen en fermentación la calidad será mejor, frecuentemente el contenido de etanol adecuado no es alcanzado en el tiempo apropiado; la fermentación del mosto de miel es difícil por el alto contenido de azúcar de la miel y la presión osmótica resultante; la acidez en la primera semana de la fermentación se incremento hasta 4,5 g/l. y es causado por la síntesis de acido acético, acido succínico, y el pH en el proceso de la fermentación reduce hasta 3,0 y 3,2 que se queda prácticamente inalterado hasta el final de la fermentación, la caída rápida del pH tiene buenas consecuencias, detiene el desarrollo de micro flora. (Sroka *et al.* 2006).

2.4.3. Levaduras

La fermentación del mosto se hará con levaduras vínicas; para prepararlas se procede de la siguiente forma, por cada 100 litros de hidromiel a preparar, procúrese 5 kg de uva blancas y maduras estrujadas, las uvas en un recipiente se estrujan luego se extrae el jugo, luego se cuela en un lienzo y se agrega en el mosto (Root, 1974), mientras tanto Lorenzen (1981) afirma que, según la levadura que se emplee en la elaboración de hidromiel, va ha producir diferencias en el producto final, en la preparación de hidromiel es sugerido la levaduras de champagne.

Existen levaduras buenas y levaduras malas, las malas se debe eliminar, las levaduras malas generalmente salvajes, dan una fermentación desagradables, estos

son las *Torulas*, aparte de dar muy poco etanol, la hidromiel que fermenta espontáneamente, gracias a las levaduras provenientes del polen fermentan mal (Caillas, 1979).

2.4.4. Técnica de elaboración

En un fermentador de 100 litros realizar la mezcla de 25 litros de miel que equivale a 37 kilogramos aprox. y 74 litros de agua, el fermentador no se llenara por completo, debido a que la primera fermentación podría rebasar el fermentador, en el fermentador colocar los nutrientes, colocar el acido tartárico en proporción de 50g. que sirve para activar la fermentación, además adicionar 50g. de polen, el polen deberá estar bien triturado y diluido en un poco de mosto sacado del fermentador, el polen sirve para dar a la fermentación fuerza y elementos nutritivos, son elementos básicos para la fermentación, la fermentación habrá concluidos cuando ya no se escucha las crepitaciones de la fermentación (Layens *et. Al* 2008). Además para la fabricación de hidromiel no es tan necesario de que color sea la miel clara o oscura, existe poca relación en cuanto la calidad de la hidromiel y calidad de la miel (Prost. 2006), La primera etapa es preparar el MOSTO de tal manera que las levaduras encuentren un medio apropiado para su vida; La segunda etapa es lograr que estas levaduras realicen la transformación de los azúcares de la miel en alcohol etílico y CO2. Fenómeno este, muy complejo por cierto, que se conoce como fermentación; La tercera etapa es que lo obtenido de esa fermentación se transforme en un producto sano, agradable, y de conservable en el tiempo (Bertello, 2001).

2.4.5. Envases de fermentación

Para efectuar la fermentación se debe emplear un barril o bordelesa de 100 ó 200 litros de capacidad, la capacidad del recipiente se debe calcular de acuerdo con la cantidad de hidromiel a elaborar y teniendo en cuenta que se llenara de mosto hasta sus nueve decimas partes, el casco o barril que se utiliza para la fermentación, debe estar perfectamente limpio e higienizado, con agua limpia deberá estar lleno dos a tres días antes de iniciar la fermentación para que hinche la madera y no exista perdidas posteriores (Root, 1974).

2.4.6. Preparación de inoculo

Es preferible activar las levaduras para iniciar la fermentación, se trata de colocar en un medio más favorable para su desarrollo, este medio no es otro que una solución de agua endulzada esterilizada, para lo cual se hace un pie de cuba con los siguientes ingredientes:

- Agua : 2 litros
- Miel : 600 g.
- Acido tartárico : 4,0 g.
- Sales nutritivas : 4,0 g.

Hacer hervir cinco minutos, dejar enfriar hasta 25 °C a 30° C. e introducir la dosis de levadura seleccionadas, la fermentación se establece en general, dentro de 48 h., al tercer día, se inocula en la pipa que contiene la totalidad del mosto estéril o pasteurizado (Caillas, 1979)

El caldo extracto de levadura, para la activación de levaduras esta compuesto por los siguientes ingredientes:

- Extracto de levaduras en polvo : 5 gramos
- Glucosa : 20 gramos
- Agua destilada : 01 litro

Luego de la disolución de los componentes, la mezcla esterilizar a 121° C por 21 min. Agregar asépticamente al litro esterilizado y enfriado a 50° C aproximadamente, 100 ml. de una solución acuosa al 0,1% de oxitetraciclina, bajo la forma de terramicina, reciente mente preparada y esterilizada por filtración, dejar enfriar a 25° C e introducir las levaduras seleccionadas, la fermentación se establece en 24 horas (Mossel, 1967).

El inoculo es la masa microbiana obtenida por cultivos en las mejores condiciones, en las que el operador busca en primer termino el aumento de crecimiento, su velocidad y vivencia microbiana; en la preparación del inoculo se requiere disponer de cepas puras, seleccionadas y probadas, capaces de rendir un alto porcentaje de producto final (Pérez, 1979), mientras tanto la adición de levaduras alcohólicas ó pie de cuba en el mosto, es siempre útil en la vinificación, tanto en la operación se hace a partir de levaduras indígenas como, aun mejor si se hace con levaduras puras seleccionadas y en plena actividad (Bremond, 1966).

2.4.7. Preparación del mosto

Según el grado alcohólico deseado en la hidromiel, se diluirá la miel, teniendo en cuenta que un grado alcohólico es producido por alrededor de 20gr. de azúcar por litro de mosto (Prost. 2006); en cuanto al rendimiento para producir un grado alcohólico es producido por 17 a 18 g. de azúcar por litro (Mesas; Alegre, 1999).

Si se desea preparar hidromiel con 12 % vol. partiendo con una miel de 75% de azúcar, debemos preparar un mosto que contenga por litro: (Prost. 2006).

$$\frac{20 \times 12 \times 100}{75} = 320g. \text{ De miel}$$

Si un litro de mosto contiene 400g. de miel con el 70% de azúcar, la hidromiel obtenido de este mosto tendrá:

$$\frac{400}{20} \times \frac{70}{100} = 14\% \text{ vol.}$$

Entonces se procede con lo siguiente:

- Añadir 750g. de agua a 250g de miel para obtener un hidromiel de 9,5% vol.
- Disolver 350 g. de miel en 650g. de agua para tener una bebida de 13% vol.

En cuanto a la cantidad apropiado de miel esta entre 25 – 30 kg y la cantidad suficiente de agua para completar a 100 litros. Como dato podemos manifestar que 25 kg de miel y 83 litros de agua, proporcionan 100 litros de hidromiel seco, con una graduación alcohólica de 10 a 11% vol.

La mezcla de 40 kg. de miel y 72 litros de agua proporcionan unos 100 litros de hidromiel abocado a dulce.

El mejor modo de preparar la mezcla de agua y miel consiste en calentar el agua en un recipiente, agregando la miel al agua caliente agitando para facilitar la disolución y separar la espuma formada (Prost, 2006), mezclamos perfectamente, Asegurar que no exista restos de abejas en la miel, si las hay las retiramos con cuidado con el colador. Comenzamos a dar calor hasta que esta mezcla hierva, y así la mantenemos por 15 minutos (sin dejar de remover), y retiramos con el colador la espuma que se forma (son proteínas desnaturalizadas que adoptan el aspecto de merengue), una temperatura cercana a los 20 °C debemos agregar el ácido tartárico disuelto en un poco de agua, el fosfato diamónico y las levaduras (Bertello, 2001). En la mezcla de agua y miel no se encuentran alimentos en cantidad suficiente para las levaduras, por lo que se recomienda agregar al mosto las sales nutritivas como

pueden ser fosfato de amonio o bitartrato neutro de amonio, acido tartárico (Resurrección, 1988).

Añadiendo a una vendimia de 10 a 20 g. de fosfato de amonio por hectolitro, casi siempre aumentan las colonias de las levaduras y se acelera la fermentación. En los mostos ricos, esta adición permitió que la fermentación alcance un grado de alcohol más elevado (Peynaud, 2003).

2.4.8. Tratamiento térmico al mosto

El mosto preparado y corregido, se procede a hervir por espacio de 8 a 10 min después del hervor se retira del fuego y se repone al agua perdida, este hecho se realiza por dos razones: primero para esterilizar el liquido y segundo para facilitar la precipitación de proteínas de la miel, para que la hidromiel aclare más rápidamente concluida la fermentación, además la pasterización del mosto se realiza con la finalidad de matar los gérmenes o microorganismos que puedan existir (Resurrección, 1988).

2.4.9. Fermentación y aditivo químico

La fermentación se iniciara dentro de las 36 horas posteriores al agregado del fermento, dejamos fermentar durante 24 horas luego se agrega 10 gramos de metabisulfito de potasio, bien pulverizado, por cada 100 litros de mosto. Para agregar el metabisulfito conviene disolver en agua tibia, al día siguiente conviene airear el mosto removiendo con ayuda de una paleta limpia, luego se activará la fermentación que ha sido un poco apagada por el agregado del metabisulfito, luego se observará la fermentación tumultuosa al cabo de unos días, luego ya se observa la fermentación lenta o complementaria, cuando empieza la fermentación lenta

conviene hermetizar bien el fermentador, la fermentación debe terminar en tres semanas o un mes como máximo, la rapidez de la fermentación aumenta con la temperatura, la fermentación es mucho más rápida a 30 °C más que a 20 °C, las levaduras transforman el 10% más de azucares en el mismo tiempo, por encima de los 30 ° C. se detiene la fermentación debido al agotamiento de las levaduras, estas fatigan a altas temperaturas (Resurrección, 1988).

2.4.10. Clarificado

Concluida la fermentación, el trasiego se hará a recipientes bien limpios y azufrados, se puede agregar tanino blanco enológico, a razón de 15 gramos por 100 litros de hidromiel, el tanino tiene por objeto facilitar la clarificación y conservación del producto, a los 20 días de haber agregado el tanino enológico, realizamos el trasiego para retirar las levaduras y sedimentos, el trasiego puede hacerse directamente a otro fermentador (Resurrección, 1988).

Cuando la hidromiel ha terminado la fermentación lo mejor es esperar que se clarifique por si misma, pues no adquiere cualidad más que envejecimiento, la hidromiel se clarifica mejor en invierno que en verano, la hidromiel una vez terminado la fermentación puede transcurrir largo tiempo, incluso meses dependerá su clarificación de la naturaleza de las mieles, no existe procedimiento de fabricación determinada para que la hidromiel tenga cualidades que le da la edad, pues es inútil apresurarse a envasarlo; un hidromiel joven es inferior a un buen vino nuevo, mientras que un hidromiel añejo es comparable con un buen vino añejo (Layens *et Al.* 2008).

2.4.11. Envejecimiento

En el proceso de envejecimiento, conviene efectuar una clarificación, agregamos tanino enológico 15 g/100 litros de hidromiel, pasado los 20 días efectuar un trasiego, a los 5 ó 6 meses la hidromiel estará listo para su consumo, para efectuar el añejamiento es necesario algunos años; es provocada por la acción del oxigeno sobre el alcohol y los esteres contenidos en la hidromiel, en una pipa de roble, el añejamiento es mucho más rápido, ya que el oxigeno del aire puede penetrar más fácilmente que sobre la superficie de un fermentador hermético (Peynaud, 2003).

Los vinos al envejecer sufren una serie de transformaciones muy profundas, el Bouquet y el sabor del vino se modifican profundamente, desaparece el aroma del vino joven, el bouquet se vuelve más intenso, más fino y más agradable. Los vinos que se obtienen pasados dos años de conservación en el fermentador o en botella, no tienen nada en común con el vino joven, con frecuencia grosero y astringente. En el premier caso el vino envejece a un alto potencial de oxidación, a un alto nivel oxidativa, en el segundo caso ocurre una oxido reducción bajo, la disolución con el oxigeno ocurre de tres maneras distintos, a través de la madera si el fermentador es de barrica de madera, por la superficie del vino y durante las operaciones de trasiego, el oxigeno disuelto no se combina directamente con las sustancias reductoras del vino, solo puede hacerlo con la intervención de ciertos cuerpos catalizadores, las sales férricas son principalmente las que actúan como activadores del oxigeno; en ausencia del hierro y del cobre, el oxigeno del aire no es activo, es incapaz de combinarse con muchas sustancias reductoras del vino, la formación de "esteres" se ha considerado como muy importante en el fenómeno de envejecimiento, los esteres se forman por acción de los ácidos sobre los alcoholes; los esteres de los vinos tienen tres orígenes diferentes: una mínima es parte

constitutiva de la uva, otra se debe a la fermentación de las levaduras y una tercera parte proviene de la reacción química de los ácidos del vino con el alcohol formado; después de la fermentación alcanza 2 a 3 meq de esteres por litro, después de 2 a 3 años alcanza 6 a 9 meq. (Peynaud, 2003).

2.4.12. Envasado

Puede envasarse en botellas de unos 200 a 500 cm^3 Con tapa de corona; un rotulo vistoso se prestará muy bien para dar buena presentación al producto; el colocar la hidromiel en botellas se remarca los cuidados de limpieza en que se debe llevar acabo esta operación, botellas limpias, bien lavadas y enjuagadas tapones nuevos, previamente ebullidos de forma cilíndrica preferible, un buen taponado no es siempre suficiente para que una botella se conserve largos años, es prudente sellarlo sobre el taponado con el corcho (Resurrección, 1988).

2.4.13. Análisis sensorial

La evaluación sensorial se ocupa de la cuantificación y medición de las características de un producto, las cuales son percibidas por los sentidos del ser humano, entre las características se puede mencionar apariencia, olor, sabor, textura, sonido, además análisis sensorial se define como una disciplina usada para medir, analizar e interpretar reacciones producidas por las características de los alimentos y cómo son percibidas por los órganos de la vista, gusto, tacto y oído, también podría producir resultados cualitativos como cuantitativos de los alimentos, (Espinoza, 2004); la cata es la práctica de prueba de vinos y se conoce como la degustación, análisis sensorial y análisis organoléptico, pero el análisis sensorial y organoléptico pretenden ser apoyo de la ciencia enológica, en la cata de vinos se evalúa el sabor del vino, el color dependiendo de la procedencia o el tipo de uva, el color, los vinos tienen una base incolora y otra amarilla, la incolora al paso del tiempo tiende a amarillo a dorada (Ruiz, 1997).

Las propiedades sensoriales son los atributos de los alimentos que se detectan por medio de los sentidos, como el color que es la propiedad de la percepción de la luz de una cierta longitud de onda de luz reflejada; el olor es la percepción por medio de la nariz de sustancias volátiles liberados en los alimentos, las pruebas para la evaluación del olor deben ser rápidas, también no deben presentarse demasiadas muestras al juez en una misma sesión; el aroma es la propiedad en la percepción de las sustancias olorosas o aromáticas de un alimento luego de haberse puesto en la boca, el aroma es el componente del sabor de los alimentos, el sabor es el atributo que combina tres propiedades, el olor, el aroma y el gusto, el sabor es la suma de los tres características; la selección y entrenamiento de los jueces que tomaran parte en pruebas de evaluación sensorial, el numero de jueces necesarios para que una prueba sensorial sea valida depende del tipo de juez que vaya ser empleada, pudiendo ser un mínimo de 7 y como máximo 15 jueces entrenados; además los criterios principales para escoger a los jueces son: la habilidad, la disponibilidad, el interés, y el desempeño. (Anzaldúa, 1994).

Las pruebas descriptivas trata de definir las propiedades del alimento y medirlas de la manera más objetiva, se evalúa la magnitud o intensidad de los atributos del alimento, pudiendo esta prueba proporcionar mucho más información acerca del producto (Anzaldúa, 1994).

3. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se llevó acabo en los laboratorios de Biotecnología, microbiología y química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, entre los meses de Setiembre del 2008 hasta Junio del 2009.

Para llevar acabo el experimento se utilizó una cepa de levadura nativa seleccionada y clasificada *(Saccharomyces sp.)* resultado del aislamiento del nicho natural de la miel de Abeja; para la selección de cepas de levaduras nativas aisladas de nicho de la miel se tomaron muestras de miel de abeja para llevar a una

fermentación espontánea, luego se consideró necesario realizar un estudio de identificación basado en técnicas morfológicas y fisiológicas; cabe mencionar que los estudios realizados son elementales y no permite identificar la especie a la que corresponden.

3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. Materia prima

Se utilizo miel de abeja, del apicultor Gilbert Bravo Hurtado, centro apícola ubicado a 2870 msnm en la localidad de Pichirhua, de la provincia de Abancay, de la región de Apurímac.

3.1.2. Levaduras

Se utilizo las cepas de levaduras aisladas en el laboratorio de biotecnología Agroindustrial, las cepas se obtuvieron de la fermentación espontanea de la miel de abeja, para su utilización fue previamente seleccionadas, caracterizadas y evaluadas en cuanto a su adaptación y metabolización de azúcares del mosto de la miel de abeja.

3.1.3. Reactivos

Los reactivos químicos utilizados en el proceso fueron, acido cítrico, acido clorhídrico en distintas concentraciones, y demás reactivos necesarios para el control o análisis químico.

Los reactivos microbiológicos utilizados son: extracto de levadura, glucosa. Fructuosa, sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa, medios de cultivo (YGC),

3.1.4. Medio de cultivo

Se utilizo caldo extracto de levadura como medio de cultivo, además se utilizo agar YGC.

3.1.5. Aditivos

Se utilizo en la selección y clasificación de levaduras nativas aisladas, específicamente en la tolerancia al metabisulfito, acido acético y demás pruebas de tolerancia y son: metabisulfito de sodio, acido acético, etanol y otros.

3.1.6. Equipos

- Se utilizo los siguientes equipos:
- Refractómetro portátil de 0 – 45%.
- Potenciómetro
- Microscopio Revelatium – 3, USA.
- Equipo de destilación
- Estufa de incubación
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Mufla
- Bidones de vidrio (da majuanas de 4 lt.)
- Diversos equipos de laboratorio

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Materia prima

3.2.1.1. Composición fisicoquímica de la miel de abeja

Se realizaron los siguientes análisis químicos en laboratorio de química.

- Determinación de azucares reductores, (AOAC 920.183).
- Determinación de humedad, Según la norma técnica peruana NTP 209.171 del INDECOPI (1999).
- Determinación de cenizas, según Norma Técnica 209.175, publicada por ITINTEC, 1980.
- pH, se usó el potenciómetro.
- Determinación de Acidez total, según (AOAC 962.19).
- Determinación de acidez total, según la norma técnica 209. 174 publicado por ITINTEC, 1980.
- Determinación de Hidroximetil Furfural (HMF), según el método cualitativo de Bianchi (García y Chirinos, 2003)
- Determinación del Índice diastásico, según el método de Bianchi (García y Chirinos, 2003).

3.2.2. Aislamiento e identificación de levaduras

Para el aislamiento e identificación de levaduras del nicho natural de la miel de abeja, se realizo una fermentación espontanea de la miel de abeja enriquecida con polen, se tomo 50,00 g. de miel de abeja y 1.00 gramo de polen, se preparo el mosto ajustándose a 15° Brix y 5.6 de pH. el mosto se coloco en un matraz de 250 ml. Para realizar una fermentación espontánea (sin adición de levaduras) por un periodo de tiempo de 4 días donde se observo presencia de levaduras.

3.2.2.1. Aislamiento de levaduras

Se tomó 5 ml de muestra de la fermentación espontánea y se llevó a un tubo de ensayo, luego se adiciono 10 ml de solución Rauling y posteriormente se dejo en reposo a 20 °C, durante 24 horas. El principio del uso de la solución Rauling se basa en la actividad isotónica que produce la solución frente a la pared celular de bacterias.

Pasado las 24 horas se realizaron diluciones de 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3} en agua peptonada estéril al 1% a partir de la muestra que contiene solución Rauling. De las diluciones se tomaron asépticamente 0,5 ml y se sembró en profundidad en agar Saboreaud al cual se le adicionó 300 mg/L de metabisulfito de sodio, a pH 3.5 como agente inhibidor de levaduras no *Saccharomyces*. Luego se llevó a incubación durante 48 horas, a 26°C ±2°C.

Las colonias crecidas en agar se resembraron en tubos con agar inclinado de igual composición, con la diferencia que en esta operación el pH se ajustó a 5,6. Luego de ello, los tubos se incubaron durante 48 horas a 26°C ±2°C.

Composición química para 100 ml de solución Rauling

- Peptona 0.50 g
- NaCl 0.85 g
- Na_2HPO_4 $12H_2O$ 0.90 g
- KH_2PO_4 0.15 g
- Agua destilada 100 ml
- pH 7.6

3.2.2.2. Mantenimiento de levaduras

Las cepas aisladas en agar inclinado se conservaron a 6°C con la finalidad de disminuir la variabilidad genética. De igual modo cada cepa se resembró en agar nuevo de igual composición cada 3 meses.

3.2.2.3. Identificación de levaduras

La identificación de géneros de levadura nativa se realizó mediante microscopia y estudio fisiológico. Para la determinación morfológica se utilizó un microscopio óptico Revelatium 3, USA. se observo a una resolución de 10X y 40X para determinar el color, apariencia y la forma de las colonias, Así mismo, en los ensayos de fisiología se utilizaron los azúcares (fructosa, glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa y almidón).

3.2.2.3.1. Estudio morfológico

Las colonias aisladas se observaron directamente en el microscopio a una resolución de 40X, así se determinaron el color, textura y la forma de las colonias desarrolladas sobre agar Sabouraud. Para la observación de células de levadura al microscopio se preparó en portaobjetos una suspensión celular a partir de las colonias aisladas y se cubrió con portaobjetos y se llevo a flamear, quedando listo para la observación al microscopio a la misma resolución; se observo la forma y color de las células como herramienta para la identificación de géneros de levaduras.

3.2.2.3.2. Estudio fisiológico

El estudio fisiológico se realizo cultivando las cepas aisladas en un medio de cultivo líquido con 2 % w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5,6. Se utilizo la técnica de fermentación en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham, para ello se tomo una azada de cada colonia crecida en agar Saboraud y se inoculó directamente en los tubos de ensayo, luego se llevó a incubación por 48 horas a 29°C ± 1°C, realizando el control de producción de CO_2 y película a las 24 horas y 48 horas.

En esta etapa del aislamiento se realizaron pruebas de tolerancia al etanol y ácido acético se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de las cepas de levadura aisladas en presencia de ácido acético y etanol, metabolitos que normalmente producen durante la fermentación alcohólica desarrollados por las levaduras saccharomyces.

Tolerancia al etanol.- La tolerancia de las cepas aisladas al etanol exógeno a distintas concentraciones se desarrolló para evaluar su capacidad fermentativa. Se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2 %w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se le añadió etanol a 97% v/v hasta alcanzar concentraciones en los tubos de 6,0% v/v; 8,0% v/v; 12% v/v; 14% v/v; 16% v/v, respectivamente. Se evaluó a una temperatura de 29°C ±1°C y se realizo el control de los resultados a las 24 horas y 48 horas, siendo 48 horas el tiempo total.

Tolerancia al ácido acético.- La tolerancia de las cepas aisladas al ácido acético se realizó para evaluar su capacidad fermentativa en medio de acido acético, se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2% w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, agregando ácido acético 98% v/v, hasta alcanzar concentraciones de 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L y 500 mg/L respectivamente, la fermentación se realizó a 29°C ±1°C durante 48 horas, los resultados se tomaron a los 24 horas y 48 horas.

Estudio producción de etanol.- Para determinar el volumen de etanol que las cepas seleccionadas son capaces de producir, se utilizo mosto de miel como medio de fermentación. El mosto de miel se preparo conteniendo 22 °Brix de sólidos totales. Las fermentaciones se realizaron a 29°C por un periodo de 16 días, y el pH del medio se ajusto a 5,6. Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 200 ml de medio de fermentación estéril, a los matraces se acondicionaron gargantas de cisne conteniendo glicerol para asegurar la esterilidad del medio, las evaluaciones de producción de etanol se realizaron a los 5 días, a los 10 días y a los 16 días, la concentración de etanol producido se determinó mediante la técnica de picnometría.

Sedimentación y formación de espuma.- Siendo la sedimentación y la formación de espuma factores a medir dentro de la selección de levaduras vínicas, se evaluó la capacidad de sedimentación rápida y formación de poca espuma, el estudio se efectuó conjuntamente con la producción de

etanol, bajo las mismas condiciones y especificaciones, la sedimentación y formación de espuma se evaluó visualmente durante el proceso de fermentación de la hidromiel en matraces.

3.2.2.4. Estudio de fermentabilidad en mosto de miel

Para la selección definitiva de cepas de levaduras nativas aisladas la cepa de levadura nativa, se sometió a evaluación controlando el poder fermentativo en mosto de miel de abeja principalmente la reducción de los grados Brix del mosto de miel, además se evaluó el comportamiento del pH, se realizo el estudio de fermentabilidad en mosto de miel para ver la cepa de levadura aislada con mejores características de fermentabilidad en mosto de miel.

3.2.3. Preparación del inoculo

El inoculo para la fermentación se cultivó en mosto de miel como medio de sustrato diluyendo la concentración de azúcar hasta 2% w/v y ajustando el pH a 5,6. el mosto a utilizar se preparo en matraces, conteniendo 200.0ml cada uno, se realizó un tratamiento térmico en autoclave a 121.0°C por periodo de tiempo de 15 min. Para asegurar la esterilidad del medio de cultivo; posteriormente se dejo enfriar hasta que el mosto tenga una temperatura de 25 a 30 °C aprox. Luego se procede a la siembra de levaduras cerca a la flama, 7 azadas de cepas de levadura para cada matraz, la propagación del cultivo se llevó a cabo en un agitador orbital a 100 rpm a 29°C durante 48 horas; la cantidad de inoculo utilizado para realizar la fermentación fue de 2,5% v/v con respecto al volumen de fermentación.

3.2.4. Preparación del mosto

El fermentador se lleno de mosto las tres cuartas partes de su capacidad, dejando un especio libre para la espuma que se puede formar durante la fermentación alcohólica, se preparó 28 litros de mosto, para lo cual se realizo el siguiente calculo. Considerando los datos de la revisión bibliográfica, 20 gramos de azúcar consumido proporciona 1,0 grado Gay Lussac de alcohol en un litro, Se planteo preparar un Hidromiel con 13° G.L. a partir de una miel con contenido de 70,8 % azucares reductores.

$$\frac{20.0g. \times 13\ \% \times 100}{70,8\%} = 367,23\ g. / L.$$

Por consiguiente, como se requiere 28 litros de mosto será:

367,23 g. / L x 28 L = 10,282 Kg. de miel

El volumen de agua a añadir a esta cantidad de miel, conociendo la densidad de la miel de abeja, es el siguiente valor:

10,282 kg de miel / 1,4225 kg. / L = 7,228 litros de miel.

Luego: 28 litros de mosto - 7,228 litros de miel. = 20,772 litros de agua.

Se añadirá 20,772 litros de agua sobre los 10,282 kg de miel.

Pesamos 10,282 Kg. de miel de abeja y depositamos en un recipiente higienizado, se agrega 20,772 litros de agua para homogenizar la miel y para mezclar componentes nutritivos como el fosfato de amonio, se homogeniza todos los ingredientes del mosto, asegurándose de que la miel este bien diluida y los insumos. Se realizó el tratamiento térmico en cocina de gas a 85 °C. temperatura de ebullición por periodo de tiempo de 10,0 min. El tratamiento térmico se realizo en batch de 14 litros considerando el mismo tiempo de pasteurizado para todos los batch. El mosto contenía 0,10% de polen, el segundo batch contenía 0,20% de

polen, de esta manera se acomoda para facilitar los tratamiento en la fermentación en dos bloques con dos concentraciones de polen 0,10% y 0,20% como medio nutritivo a dos temperatura 20 ° C y 30 ° C.

El mosto pasteurizado se trasvasa a los fermentadores higienizados 3,5 litros cada uno, los fermentadores estuvieron provistos de tapones y sus manguerillas respectivas, posteriormente se dejo en reposo para enfriar hasta una temperatura aprox. De 25 °C en el mosto.

3.2.5. Inoculación y fermentación

Una vez que el mosto adquirió la temperatura deseada, se inoculo en condiciones estériles cerca a flama, se realizo la operación con pipetas esterilizadas el volumen de inoculo fue 2,5% del volumen total del mosto.

El proceso de fermentación se llevo acabo en un fermentador artesanal, bidones de vidrio (damajuanas) provistos de manguerillas para toma de muestra y trampa de CO2, a las 24 horas iniciada la fermentación se adicionó 0,10 g. de metabisulfito de sodio pulverizado por cada litro de mosto.

La fermentación se llevo acabo a medio ambiente 20 °C promedio y en ambiente controlado de 30 °C. la cepa levadura *Saccharomyces sp.* Con dos concentraciones de polen como fuente de nutriente, resultando 8 tratamientos en total.

Se realizo controles cada 48 horas los parámetros de sólidos solubles y pH, se considero la toma de muestra desde el momento de la inoculación de levaduras.

3.2.6. Clarificación

Concluida la fermentación, el clarificado se realizo a través de 2 trasiegos, se realizo a recipientes higienizados utilizando un sifón y por gravedad, el primer trasiego se realizo para retirar el sedimento, el segundo trasiego se realizo a los 20

días pasados del primer trasegado se realizo el segundo trasegado cuando la hidromiel se mostró límpido, formando una capa reducida de sedimento en la base del fermentador, no se utilizo clarificante en vista que Layens (2008) afirma que es mejor esperar que clarifique la hidromiel por si misma.

3.2.7. Envasado

El envasado se realizo en forma artesanal en botellas de vidrio de 750 ml de capacidad higienizados previamente, las botellas con contenido de hidromiel se encorcharon manualmente con corchos cónicos higienizados previamente.

3.2.8. Evaluación de la calidad de la hidromiel

Al finalizar el proceso de elaboración de la hidromiel, luego de la fermentación, clarificado, se evaluó la calidad fisicoquímica y sensorial de la hidromiel.

Evaluación fisicoquímica.- El control fisicoquímico de la hidromiel se realizo transcurrido 2 meses iniciada la elaboración de la hidromiel, se efectuaron evaluaciones de porcentaje de etanol producido, acidez total, pH por la técnica de potenciometría.

Evaluación sensorial.- Para evaluar la calidad sensorial de la hidromiel se realizo a través de la prueba descriptiva cuantitativa, para los atributos de intensidad de color amarillo pálido, intensidad de aroma, sabor agrio, sabor a levadura, sabor alcohólico, sabor a miel, sabor a polen y aceptabilidad general; los paneles de juzgamiento estuvieron conformados por jueces semi entrenados. Para la selección

de los jueces se tomo en cuenta edad, sexo, es necesario mencionar que la evaluación sensorial se hizo con la finalidad de evaluar la aceptabilidad de la hidromiel, los jueces fueron entrenados en cuanto a evaluación sensorial de vinos y bebidas alcohólicas con clases teóricas y practicas, se seleccionó a los jueces, quedando una terna que pueden diferenciar con facilidad los atributos sensoriales de la hidromiel, se utilizaron cartillas de respuesta para recolectar las puntuaciones obtenidas por cada juez.

Diseño experimental.- En el presente estudio el diseño experimental utilizado fue el diseño factorial $N = 2^n$; se manejaron dos variables independientes; temperatura con dos niveles (20°C, 30°C) y concentración de polen con dos niveles (0.10%, 0.20% w/v), las variables dependientes son: etanol (%), Acidez total (meq/Kg.) y pH; se realizo una optimización de temperatura y adición de polen como fuente de sustrato para la levadura nativa, el numero de tratamiento utilizado es $N = 2^2 = 4$ tratamientos efectuados por duplicado, la ecuación modelo para la optimización es: $Y_i j_k = \alpha + \beta_1 T_1 + \beta_2 P_1 + \beta_{1,2} T_1 P_1 + \varepsilon_i j_k$, donde $\alpha = 5\%$ de error y 95% limite de confianza.

Análisis estadístico.- El análisis estadístico se realizo para ver las significancias estadísticas de la producción de Etanol, acidez total y pH en la hidromiel; el P-valor calculado se comprueba con la media al cuadrado contra una estimación del error experimental, el procesamiento estadístico se realizó al 95% del nivel de confianza y con 5% de error experimental, el análisis se realizó con el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición fisicoquímica de la miel de abeja

La composición fisicoquímica de la miel de abeja se evaluó antes del uso en la fermentación alcohólica, la muestra de miel de abeja procedió del distrito Pichirhua – Provincia Abancay y Región Apurímac, posterior al análisis fisicoquímico se utilizo la miel de abeja como materia prima para el proceso de obtención de la hidromiel con una cepa de levadura aislada.

Azucares reductores.- El resultado promedio obtenido de la muestras de miel fue: 70,79 ± 0,098 %, según ITINTEC (1980), norma 209.168 establece un mínimo de 65%, mientras tanto Prost (2006) señala 79.59%; además Jerkovic *et. al.* (2010) en el estudio de "contribución y caracterización de la miel: composición de aroma, mercado de la miel, compuestos y actividad antioxidante", reportó 74.495% de azucares, el resultado obtenido se encuentra dentro de lo reportado por la ITINTEC, además el resultado se encuentra por debajo del resultado hallado por Prost (2006) y Jerkovic *et. al.* (2010); se afirma del resultado obtenido, que los azucares reductores que la materia prima posee es un porcentaje adecuado como nutrientes para las levaduras en el proceso de fermentación alcohólica en la obtención de la hidromiel.

Humedad.- El valor obtenido es 17,53 ± 0,081 %, Jerkovic *et al.* (2010) reporta 21.3%, mientras tanto la ITINTEC (1980) establece un valor como máximo 21%; Prost (2006) reporta 17,20% de humedad, el resultado obtenido se encuentra por debajo del valor establecido por la ITINTEC, además se encuentra por debajo del valor hallado por Prost (2006), pero el valor encontrado por Jerkovic *et. al.* (2010) es superior incluso al valor establecido como máximo por la ITINTEC; se asevera del resultado que la humedad esta en función de los sólidos solubles, además indica el grado de madurez y

concentración de carbohidratos en la miel, puesto que resultado obtenido esta dentro de los valores hallados por otros autores y es adecuado para el uso en la obtención de hidromiel.

Ceniza.- La ITINTEC (1980) reporta un máximo de 0,6%, mientras tanto Prost (2006) reporta 0,17%; en la investigación se hallo 0,45 ± 0,031 % valor cercano al establecido por la ITINTEC (1980) y por encima del valor hallado por Prost (2006) publicado en su libro "Apicultura: conocimiento de la abeja, manejo de la colmena", el resultado obtenido es alto en comparación de los resultados obtenidos por los autores señalados, la diferencia es básicamente debido al contenido de minerales de la miel, que esta en relación a la procedencia de la miel y la flora melífera.

Sólidos solubles totales.- se determinó a través del índice de refracción a una temperatura promedio de 20°C. Que correspondió a 80,83 ± 0,289 °Brix. Mientras tanto Pérez (1996) reporta un valor de 84° Brix, el contenido de sólidos solubles totales esta en función de la madurez de la miel de abeja.

pH.- el valor obtenido es 4,32 ± 0,100, valor cercano al valor obtenido por Pérez (1996) 4,18, mientras tanto Resurrección (1988) reporta 3,96 en el estudio "Factibilidad Técnica de Elaboración de Hidromiel", también Rinaldi (1971) señala que podría estar entre los valores de 3,2 y4,9; el valor encontrado en la investigación se encuentra dentro de los valores reportados por otros investigadores.

Acidez total.- Rinaldi (1971) reporta valores entre 0,348 y 0,052, mientras tanto Pérez (1996) reporta un valor de 0,196. En el presente análisis se determinó 0,15 ± 0,009, valor cercano al valor obtenido por Pérez (1996) y esta por debajo del valor establecido como máximo por ITINTEC (1980) pH de 4 como máximo, además del resultado obtenido se deduce que la variación de la acidez total es por consecuencia de los factores, como el origen de la flora melífera, estación del año y factores medioambientales.

Índice diastásico.- El índice diastasico es conocido también como poder diastasico, se hallo un índice diastasico de 4,53 ± 0,076, sin embargo la ITINTEC (1980) reporta como índice diastasico de 3, y Resurrección (1988) afirma en el estudio "Factibilidad Técnica de Elaboración de Hidromiel" hallo un índice diastasico de 8, el valor hallado se encuentra por encima del valor reportado por la ITINTEC y por debajo del resultado de Resurrección; ITINTEC (1980) afirma que el índice diastasico permite establecer el grado de frescura y autenticidad de la miel de abeja.

Hidroximetil furfural.- Prost (2006) afirma que podría estar entre los valores de 40mg/Kg y 80mg/Kg. dependiendo del clima donde se produce, mientras tanto Resurrección (1988) encontró un HMF de 40mg/Kg. el valor obtenido en la presenta investigación es 38,30 ± 0,854 mg/1000g. de miel de abeja, valor cercano al obtenido por Resurrección (1988); se asevera que Prost (2006) en su libro "Apicultura: conocimiento de la abeja, manejo de la colmena" afirma que la miel una vez depositada en el panal ocurre un envejecimiento natural, además el HMF se produce por tratamientos térmicos de la miel.

Densidad.- A 20°C según la ITINTEC (1980) reporta como mínimo 1,37 g/cc, mientras tanto prost (2006) reporta 1,410 y 1,435, el valor obtenido fue 1,42 ± 0,016 g/cc., coincidiendo con el reporte de (Resurrección, 1988) que reportó 1,420 g/cc., además el valor encontrado se ubica por encimas del establecido por la ITINTEC (1980).

Tabla 03. Características a nivel fisicoquímico de la miel de abeja

Principales componentes	
Azucares reductores	70,79 ± 0,098 %
Humedad	17,53 ± 0,081 %
Ceniza	0,45 ± 0,031 %
Sólidos solubles totales	80,83 ± 0,289 °brix.
pH	4,32 ± 0,100
Acidez total	0,15 ± 0,009 %
Índice diastásico	4,53 ± 0,076
Hidroximetil furfural	38,30 ± 0,854 mg/kg.
Densidad	1,42 ± 0,016 g/cc.

Fuente: Elaboración propia

4.2. Aislamiento e identificación de levaduras nativas

La Tabla 03 muestra las cepas de levadura aisladas de la miel de abeja, se aislaron tres cepas de levadura y se codificaron cada una respectivamente, para su identificación y posterior selección y clasificación, como se señala a continuación.

Tabla 04. Cepas de levaduras aisladas del nicho de la miel

Cepas	**Género**	**Símbolo**
Cepa A	*Saccharomyces sp.*	*S.sp.* BA-IA-2009-I
Cepa B	*Saccharomyces sp.*	*S.sp.* BA-IA-2009-II
Cepa C	*Saccharomyces sp.*	*S.sp.* BA-IA-2009-III

Fuente: Elaboración propia.

4.2.1. Estudio morfológico

Las colonias que se aislaron presentaron: color de la colonia blanquecina, apariencia brillante, de forma circular con bordes irregulares y sin anillos, las cepas de levaduras presentan formas circulares, color cremas, además (Madigan, Martinco y Parker) señalan que las levaduras del genero ascomicetos normalmente son ovales o casi cilíndricas, mientras tanto Regodón (2003) señala que las levaduras del genero *Saccharomyces* morfológicamente son esféricas o elipsoidales y presentan color crema mantecoso, sus colonias son lisas, circulares y muy prominentes, del estudio morfológico se asevera que las cepas de levadura aisladas del nicho natural de la miel son del genero *Saccharomyces.*

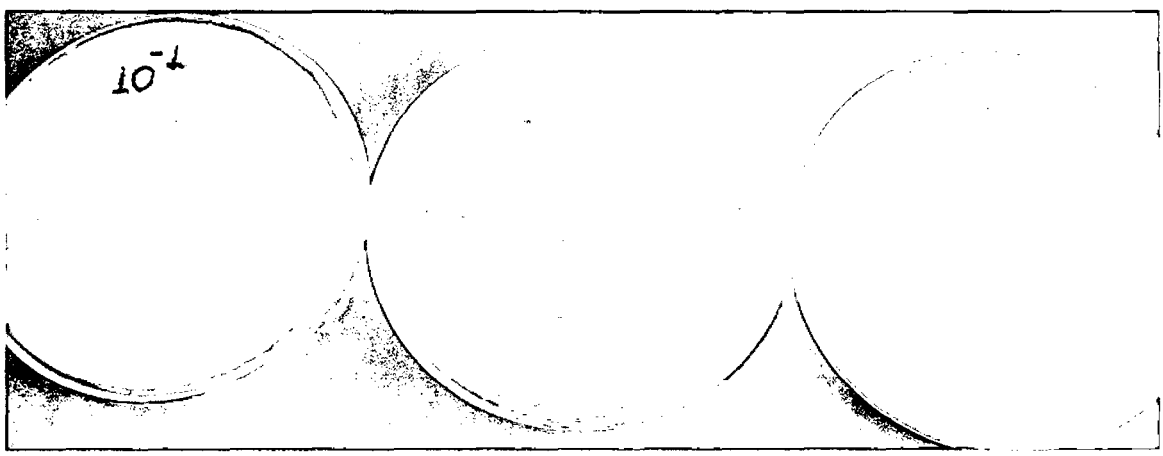


Figura 01. Colonias de levaduras en placas petri en dilución de 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}

Figura 02. Colonia de levaduras de la dilución 10^{-3}

4.2.2. Estudio fisiológico

4.2.2.1. Tolerancia al metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$)

La Tabla 04 muestra la tolerancia al metabisulfito de las cepas de levaduras aisladas del nicho natural de la miel de abeja, se evaluó a través de puntuaciones con aspas (*) y más (+) de acuerdo a la intensidad, observando la formación de film y producción de CO2 en la fermentación en tubos durhan.

Tabla 05. Evaluación de la tolerancia al metabisulfito de sodio

Concentración / Cepa			200 ppm			300 ppm			400 ppm		
			pH. 3	pH.3.5	pH. 4	pH. 3	pH.3.5	pH. 4	pH. 3	pH.3.5	pH. 4
A	24 hr.	CO2	-	*	*	-	-	-	-	-	-
		Film.	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	48 hr.	CO2	**	***	***	-	*	**	-	-	-
		Film.	++	+++	+++	-	+	++	-	-	-
B	24 hr.	CO2	-	*	*	-	-		-	-	-
		Film.	*	+	+	-	-	-	-	-	-
	48 hr.	CO2	**	***	***	-	-	-	-	-	-
		Film.	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
C	24 hr.	CO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Film.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 hr.	CO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Film.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Producción de CO_2: Intenso: ***, Moderado: **, Débil: *.

Formación de film sobre la superficie del medio: intenso: +++, Moderado: ++, Débil: +.

En la Tabla 04 se puede observar de acuerdo a los resultados obtenidos que,

La cepa C, no es tolerante al metabisulfito, tampoco tiene indicios de fermentación por tanto no se considera en estudios posteriores, se considera que es una levadura no *Saccharomyces.*, mientras tanto la cepa A tiene tolerancia al metabisulfito hasta 300ppm a los 48 horas; Mesas y Alegre (1999) señala que las

levaduras del genero *Saccharomyces* toleran altas concentraciones de metabisulfito, encontrándose tolerancia de metabisulfito hasta 250mg/l; además Mas, Torija, *et al.* (2006) afirma que es una característica deseable la resistencia del sulfito, mientras tanto la cepa B presenta características similares a la cepa A en cuanto a la tolerancia al metabisulfito, sin embargo la producción de CO2 y la formación de film se ve de manera reducida que la cepa A.

4.2.2.2. Fermentabilidad de azucares

La Tabla 05 muestra la capacidad fermentativa de azucares por las levaduras aisladas del nicho natural de la miel de abeja, se evaluó a través de puntuaciones con aspas (*) y más (+) de acuerdo a la intensidad, observando la formación de film y producción de CO2 en la fermentación en tubos durhan, la capacidad fermentativa se realizó en azucares como la fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa y almidón, las evaluaciones se realizaron a los 24 horas y 48 horas.

Tabla 06. Capacidad fermentativa de azúcares por levaduras aisladas

Cepa / Fuente de carbono		Cepa A		Cepa B	
		Formación de CO2	Formación de film (película)	Formación de CO2	Formación de film (película)
Fructosa	24 hr.	***	+++	***	+++
	48 hr.	***	+++	***	+++
Glucosa	24 hr.	**	++	***	+++
	48 hr.	***	+++	***	+++
Maltosa	24 hr.	-	-	-	-
	48 hr.	**	++	-	-
Galactosa	24 hr.	-	-	-	-
	48 hr.	-	-	-	-
Sacarosa	24 hr.	***	+++	*	+
	48 hr.	***	+++	**	++
Almidón	24 hr.	-	-	-	-
	48 hr.	-	-	-	-

Producción de CO_2: Intenso: ***, Moderado: **, Débil: *.

Formación de film sobre la superficie del medio: intenso: +++, Moderado: ++, Débil: +.

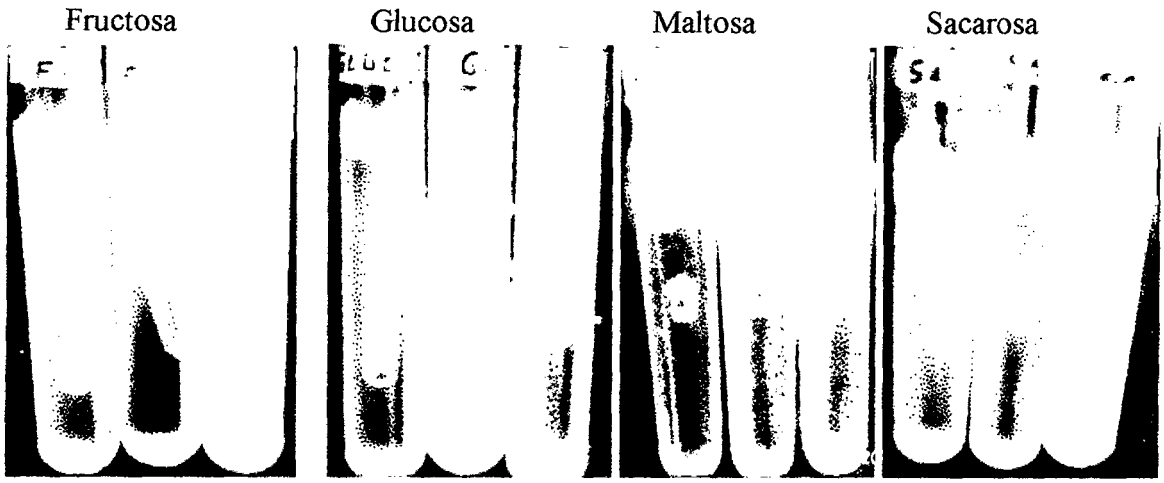


Figura 03. Fermentabilidad en azucares por cepas aisladas

La cepa A y B presentan características similares en la fermentación de azucares, como fructuosa y glucosa, observándose una formación de CO2 y formación film intenso a las 24 horas y 48 horas, esta similitud nos conlleva asemejar ambas levaduras, además Mesas y Alegre (1999) señala que una fermentación alcohólica se observa con la producción de CO2 y producción de compuestos secundarios y es característico de levaduras del genero *Saccharomyces.;* también Mas, Torija *et al.* (2006) afirma que es una característica deseable la degradación total de los azucares fermentables en el mosto por las levaduras.

4.2.2.3. Tolerancia al etanol

La Tabla 06 muestra la tolerancia al etanol por las levaduras aisladas del nicho natural de la miel de abeja, las concentraciones de etanol fueron 6.0%, 8.0%, 12%, 14% y 16% se evaluó a través de puntuaciones con aspas (*) y

más (+) de acuerdo a la intensidad, observando la formación de film y producción de CO2 en la fermentación en tubos durhan, las evaluaciones se realizaron a los 24 horas y 48 horas.

Tabla 07. Evaluación de tolerancia al etanol por cepas aisladas

Levadura / Concentración de etanol		Cepa A		Cepa B	
		Formación de CO_2	Formación de film (película)	Formación de CO_2	Formación de film (película)
6.0 %	24 hr.	***	-	**	-
	48 hr.	***	++	***	++
8.0 %	24 hr.	**	-	**	-
	48 hr.	***	+++	**	+
12 %	24 hr.		-	-	-
	48 hr.	*	-	-	-
14 %	24 hr.	-	-	-	-
	48 hr.		-	-	-
16 %	24 hr.	-	-	-	-
	48 hr.	-	-	-	-

Producción de CO_2: Intenso: ***, Moderado: **, Débil: *.

Formación de film sobre la superficie del medio: intenso: +++, Moderado: ++, Débil: +.

La cepa B tuvo una tolerancia moderado a 8% de etanol a los 48 horas, mientras tanto, la cepa A toleró 12 % de etanol a los 48 horas, mostrando una producción de CO2 débil y a las 48 horas con 8% de etanol muestra una formación de film intenso, además Mesas y Alegre (1999) señala que las levaduras del genero *Saccharomyces* toleran altas concentraciones de etanol, pudiendo tolerar hasta 17 % los del genero *Saccharomyces cerevisiae,* y los del genero *Saccharomyces bayanus* tiene poder alcohologeno de 18%; también Mas, Torija *et al.* (2006) afirma que es una característica muy buena la alta tolerancia al etanol por las cepas de levaduras.

4.2.2.4. Tolerancia al acido acético

La Tabla 07 muestra la tolerancia al acido acético por las levaduras aisladas del nicho natural de la miel de abeja, las concentraciones de acido acético fueron: 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, se evaluó a través de puntuaciones con aspas (*) y más (+) de acuerdo a la intensidad, observando la formación de film y producción de CO2 en la fermentación en tubos durhan, las evaluaciones se realizaron a los 24 horas y 48 horas.

Tabla 08. Evaluación de tolerancia al ácido acético por cepas aisladas

Levaduras		**Cepa A**		**Cepa B**	
Concentración de ácido acético		Formación de CO_2	Formación de film (película)	Formación de CO_2	Formación de film (película)
100ppm	24 hrs.	***	++	***	+++
	48 hrs.	***	+++	***	+++
200ppm	24 hrs.	***	++	***	+++
	48 hrs.	***	+++	***	+++
300ppm	24 hrs.	*	+	***	+++
	48 hrs.	**	++	***	++
400ppm	24 hrs.	-	-	*	+
	48 hrs.	*	+	**	++
500ppm	24 hrs.	-	-	-	-
	48 hrs.	-		-	-

Producción de CO_2: Intenso: ***, Moderado: **, Débil: *.

Formación de film sobre la superficie del medio: intenso: +++, Moderado: ++, Débil: +.

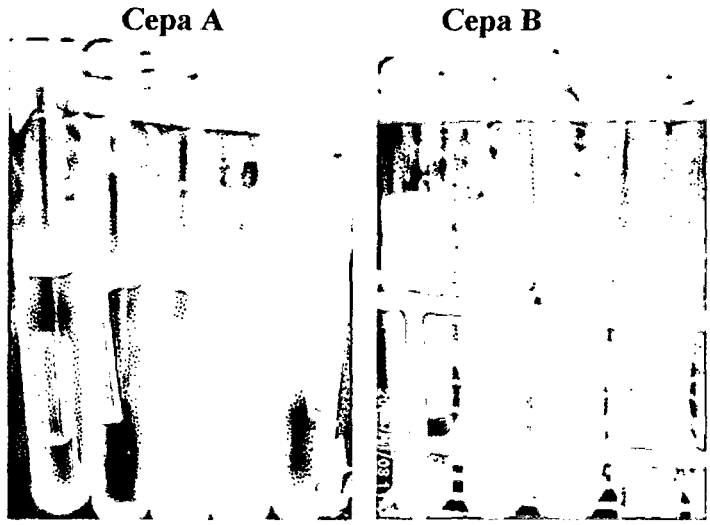


Figura 04. Tolerancia al acido acético por cepas aisladas

Resistencia al acido acético a los 48 hr. A 100, 200 y 300 ppm.

La cepa B, tiene una tolerancia intensa a 100ppm, 200ppm y 300ppm a los 24 y 48 horas, de igual manera la formación de film se observa intenso hasta 24 horas a 300ppm de acido acético, mientras tanto la cepa A muestra una tolerancia relativa, mostrando tolerancia moderada a 300ppm y 48 horas; además Mas, Torija, *et. al.* (2006) afirma que la producción de acido acético por las levaduras es una característica no deseable en la fermentación alcohólica, como también la producción de acidez volátil.

4.2.2.5. Producción de etanol

La Tabla 08 muestra la capacidad de producción de etanol por las cepas de levaduras A y B aisladas del nicho natural de la miel de abeja, las concentraciones de etanol se determinaron a los 5 días, 10 días y 16 días de fermentación.

Tabla 09. Evaluación de producción de etanol por cepas aisladas.

Cepa de Levaduras / Tiempo	Producción de etanol (%)	
	Cepa A	Cepa B
Día 5	4,53 ± 0,771	3,31 ± 0,315
Día 10	6,84 ± 0,404	5,26 ± 0,275
Día 16	8,22 ± 0,220	7,51 ± 0,210

Fuente: Elaboración propia

De la producción de etanol en 16 días se observa que la cepa A aislada del nicho natural de la miel es buen productor de etanol, produciendo 8,2% de etanol en 16 días, el medio o mosto estuvo en condiciones óptimas para la supervivencia de las cepas; Mas, Torija *et. al.* (2006) señala que es una buena característica en la fermentación alcohólica la total degradación de los azucares fermentables, como también la capacidad fermentativa a bajas temperatura y altas presiones.

4.2.2.6. Sedimentación y producción de espuma

La Tabla 09 muestra la capacidad de sedimentación y formación de espuma por las cepas de levaduras A y B aisladas del nicho natural de la miel de abeja, las evaluaciones se efectuaron a través de puntuaciones con aspa (*) y más (+), de acuerdo a la intensidad, observando la sedimentación muy turbio, algo de turbidez y sin turbidez, mientras tanto la producción de espuma se evaluó observando una formación de espuma intenso, moderado y débil en el proceso de fermentación.

Tabla 10. Sedimentación y formación de espuma por cepas aisladas.

Levaduras Días de fermentación	Cepa A		Cepa B	
	Sedimentación	F. Espuma	Sedimentación	F. Espuma
4 día	-	+++	-	+++
6 día	-	+++	-	+++
7 día	-	++	-	+++
8 día	-	++	-	++
10 día	***	+	***	+
12 día	***	-	***	+
14 día	**	-	***	-
16 día	*	-	**	-

Sedimentación: muy turbio: ***, algo de turbio: **, sin turbidez: *.

Formación de espuma sobre la superficie: intenso: +++, Moderado: ++, Débil: +.

Se observo que a los 16 días la cepa A tiene una sedimentación más apropiada que la cepa B, también en cuanto a la formación de espuma se observo que la cepa A posee poca formación de espuma; Mas, Torija *et. al.* (2006) señala que es una característica no deseable en la fermentación alcohólica la producción de espuma.

Teniendo como resultados de los estudios morfológicos y fisiológicos de las cepas de levadura aisladas del nicho natural de la miel de abeja, se tiene la cepa A de genero *Saccharomyces sp. Con símbolo S. sp.* BA-IA-2009-I, con mejores características fisiológicas para la metabolización de los azucares presentes en la miel de abeja, se obtendrá la hidromiel utilizando la cepa A *Saccharomyces sp. (S. sp.* BA-IA-2009-I).

4.2.3. Obtención de hidromiel con cepa seleccionada (*S. sp.* BA-IA-2009-I).

4.2.3.1. Controles iniciales al mosto

Se preparo y se corrigió 28 litros de mosto con las siguientes características:

Sólidos solubles totales : 23.0° Brix.

Acidez total : 0.0440 meq. de acido sulfúrico/Kg.

pH inicial : 3.80

PH ajustado : 4.20

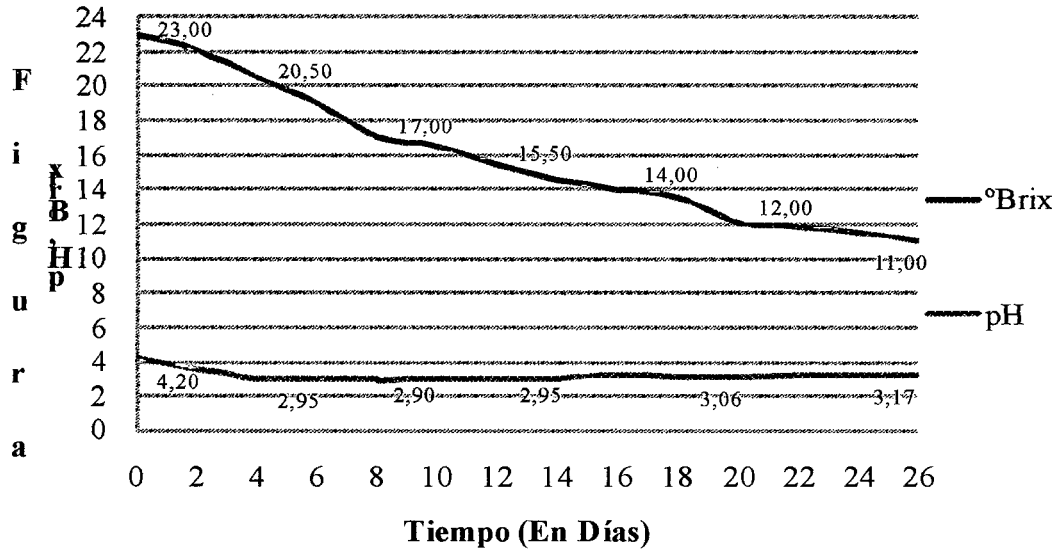
4.2.3.2. Variación de los grados Brix y pH durante la fermentación

La Tabla 10 muestra la variación de los grados Brix y el pH durante la fermentación alcohólica de la hidromiel, la fermentación alcohólica se llevo acabo durante 16 días y las evaluaciones de ° Brix y pH se efectuaron cada 2 días.

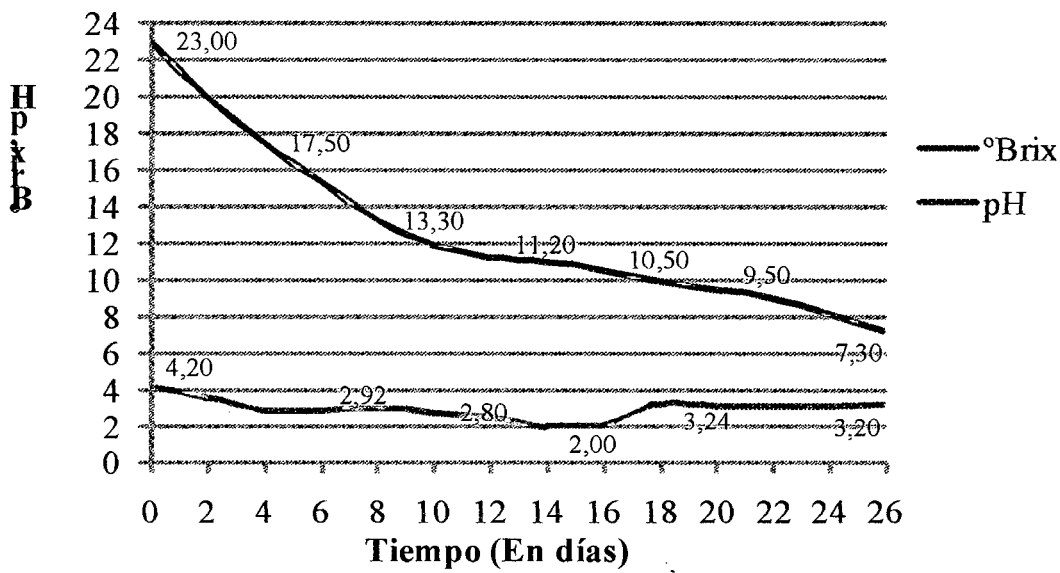
Tabla 11. Variación de ° Brix y pH durante la fermentación de hidromiel

Tiempo (días)	Fermentación a 20°C		Fermentación a 30°C	
	° Brix	pH	° Brix	pH
0	23,00	4,20	23,00	4,20
2	22,00	3,50	20,00	3,60
4	20,50	2,95	17,50	2,85
6	19,00	2,92	15,40	2,92
8	17,00	2,90	13,30	2,95
10	16,50	2,93	12,00	2,80
12	15,50	2,95	11,20	2,50
14	14,50	2,95	11,00	2,00
16	14,00	3,18	10,50	2,10
18	13,50	3,06	10,00	3,24
20	12,00	3,10	9,50	3,12
22	11,80	3,16	9,00	3,14
24	11,50	3,17	8,20	3,16
26	11,00	3,17	7,30	3,20

Fuente: Elaboración propia



05. Variación de grados Brix y pH con respecto al tiempo, a 20 °C.



06. Variación de grados Brix y pH con respecto al tiempo, a 30 °C.

La fermentación alcohólica se realizo con la cepa A *Saccharomyces sp.* ***(S. sp.* BA-IA-2009-I)**, levadura aislada del nicho natural de la miel de abeja, la fermentación estuvo sujeto a un factor de temperatura con dos niveles (20°C y

30°C), el segundo factor fue adición de polen también con dos niveles (0,10 % y 0,20%).

En la **Figura** 05 se muestra un descenso de los grados Brix de manera lenta, llegando a un máximo de 11 ° Brix en 26 días a 20 °C, además el comportamiento del pH no muestra mucha variabilidad, obteniéndose a los 16 días un valor de 3.17, mientras tanto a los 14 días tuvo una reducción hasta 14 de pH, el comportamiento del pH en los primero días de la fermentación se reduce, luego incrementa considerablemente; la reducción brusca del pH en una primera etapa de la fermentación es debido que las levaduras consumen los azucares y existen alta concentración de ácidos orgánicos, mientras tanto cuando el pH incrementa es debido a la reducción de los ácidos orgánicos en el mosto.

Además En la Figura 06 se observa un descenso acelerado de los grados Brix, obteniéndose a los 26 días de fermentación un valor de 7.30 inferior a la fermentación a 20 °C, Mesas y Alegre (1999) explica que la temperatura es un factor importante en la fermentación, a mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre rápidamente, además las levaduras a 30°C se desarrollan muy rápido; mientras tanto el comportamiento del pH es muy variable, se observa un descenso acelerado llegando al día 14 con 2, y luego se muestra un ascenso hasta llegar a 3.20 de pH a los 16 días.

4.2.3.3. Controles al producto final

La Tabla 12 muestra el análisis fisicoquímico realizado al hidromiel, los análisis realizados fueron porcentaje de etanol, acidez total, y pH; el análisis fisicoquímico al hidromiel se efectuó concluida el proceso de fermentación.

Tabla 12. Análisis fisicoquímico al hidromiel

Variables del Proceso		Variables de Respuestas		
Temperatura (°C)	**Polen (%)**	**Etanol (%)**	**Acidez (meq. acido sulf./Kg)**	**pH**
20,0	0,10	10,1	0,27	3,1
30,0	0,20	11,9	0,249	3,22
30,0	0,10	10,3	0,243	3,19
20,0	0,20	10,4	0,306	3,17
20,0	0,10	10,2	0,31	3,2
30,0	0,20	12,8	0,264	3,29
30,0	0,10	11,3	0,234	3,22
20,0	0,20	11,9	0,264	3,17

La fermentación alcohólica se realizo con una cepa de levadura aislada del nicho natural de la miel de abeja con código *(S. sp.* **BA-IA-2009-I)**; la fermentación se realizo con dos variables independientes cada una con dos niveles: temperatura (20°C y 30°C), y adición de polen (0,10 % y 0,20%).

Del cuadro se asevera que la fermentación a 30 ° C se desarrolla rápidamente, produciendo hasta 12.8% de etanol con una concentración de 0,20% de polen como nutrientes para las levaduras a 30°C, mientras tanto a una temperatura ambiente de 20 °C con concentración de 0,10% de polen produjo 10, 1% de etanol; Mesas y Alegre (1999) afirma también que a temperaturas elevadas la fermentación alcohólica es acelerada, (Culbertson, Duncan 2006; Mesas y Alegre, 1999) afirman, los nutrientes en el mosto influyen en la producción de etanol y compuestos secundarios, aseveran también que las sustancias nitrogenadas son factores determinantes para el desarrollo de las levaduras.

4.2.3.4. Análisis estadístico

La cepa de levadura (A) aislada de la miel de abeja resulto ser el mejor, se adapto mejor al mosto de miel de abeja, además fermentó mejor el mosto de la miel, se realizó una optimización de temperatura y adición de polen como fuente de sustrato para las levadura nativa, para ello se trabajó con dos factores de entrada (temperatura y adición de polen) con dos niveles cada uno (20° C, 30° C y 0.10%, 0.20%), los factores a medir del producto son % de etanol, Acidez, pH, Color, Olor, Sabor y aceptabilidad general.

El numero de tratamientos estuvo sujeto a un diseño factorial de $N = k^n$; el numero de variables son dos entonces se tiene $N = 2^2 = 4$ tratamientos, los tratamientos se efectuaron por duplicado, la ecuación modelo para la optimización es: $Y_i j_k = \alpha + \beta_1 T_1 + \beta_2 P_1 + \beta_{1,2} T_1 P_1 + \varepsilon_i j_k$, donde $\alpha = 5\%$ de error y 95% limite de confianza, los datos se analizaron con STATGRAPHICS Plus Versión 5.1.

Tabla 13. Análisis de varianza para etanol

Análisis de la Varianza para Etanol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Temperatura	1,71125	1	1,71125	10,19	0,0496
B:Polen	3,25125	1	3,25125	19,36	0,0218
AB	0,15125	1	0,15125	0,90	0,4126
bloques	1,53125	1	1,53125	9,12	0,0568
Error Total	0,50375	3	0,167917		
Total (corr.)	7,14875	7			

R-cuadrado = 92,9533 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 87,6683 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,409776

Error absoluto de la media = 0,19375

Los efectos, temperatura y la adición de polen tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza, sin embargo la interacción de la temperatura y el polen no tienen influencia significativa en el etanol.

La ecuación modelo matemático es:

Etanol = 8,95 + 0,01*Temperatura - 1,0*Polen + 0,55*Temperatura*Polen

Además los parámetros optimizados para Etanol es: 30°C de temperatura y 0.20% de adición de polen, para la producción de un valor optimo de 12,35 % de etanol.

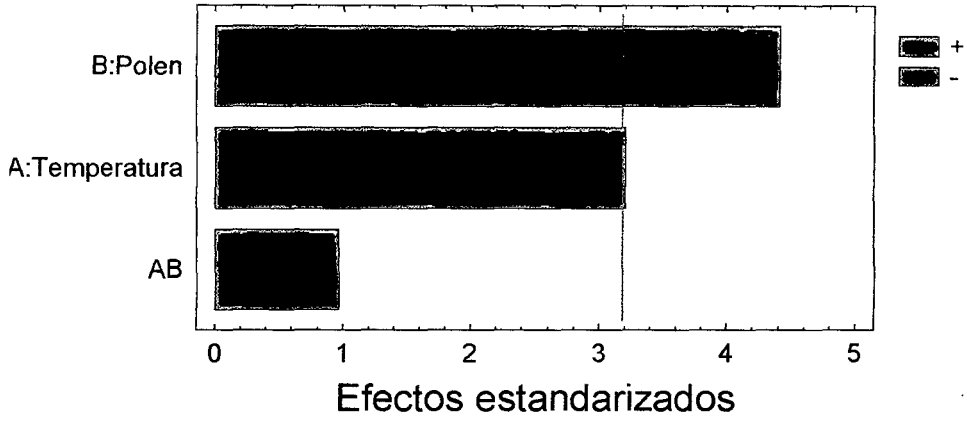


Figura 07. Grafico de Pareto para Etanol

De la figura 07. Del grafico de Pareto para etanol se asevera que el factor temperatura se encuentra cerca a la línea de límite óptimo, indica que la temperatura tiene influencia significativa en la producción de etanol, mientras tanto la concentración de polen tiene mínima influencia significativa en la producción de etanol.

Tabla 14. Análisis de varianza para Acidez

Análisis de la Varianza para Acidez

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Temperatura	0,0032	1	0,0032	5,24	0,1061
B:Polen	0,0000845	1	0,0000845	0,14	0,7347
AB	0,0002645	1	0,0002645	0,43	0,5576
bloques	0,000002	1	0,000002	0,00	0,9580
Error Total	0,001833	3	0,000611		
Total (corr.)	0,005384	7			

R-cuadrado = 65,9547 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 40,4207 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,0247184

Error absoluto de la media = 0,01325

En este análisis, ninguno de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza, la temperatura y la adición de polen no tienen influencia significativa en la Acidez.

La ecuación modelo matemático es:

Acidez = 0,444 - 0,00745*Temperatura - 0,51*Polen + 0,023*Temperatura*Polen

Los parámetros optimizados para Acidez son: 20°C de temperatura y 0.10% de adición de polen, para obtener un valor optimo de 0,29 de acidez.

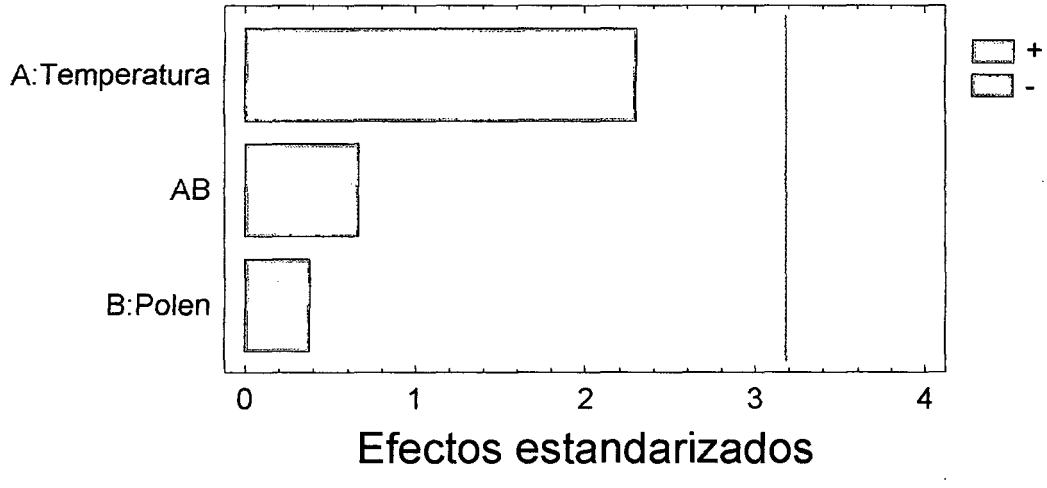


Figura 08. Grafico de Pareto para Acidez

De la Figura 08. Grafico de Pareto para Acidez se asevera que ninguno de los factores se encuentran cercanos a la línea de límite óptimo, la temperatura como la concentración de polen en el mosto de miel de abeja no influyen significativamente en la acidez final de la hidromiel.

Tabla 15. Análisis de varianza para pH

Análisis de la Varianza para pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Temperatura	0,0098	1	0,0098	10,14	0,0499
B:Polen	0,00245	1	0,00245	2,53	0,2096
AB	0,00045	1	0,00045	0,47	0,5440
bloques	0,005	1	0,005	5,17	0,1075
Error Total	0,0029	3	0,000966667		
Total (corr.)	0,0206	7			

R-cuadrado = 85,9223 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 75,3641 por ciento

Error Estándar de Est. = 0,0310913

Error absoluto de la media = 0,0175

En el Análisis de varianza para pH, uno de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza, la temperatura tienen influencia significativa en el pH.

La ecuación modelo matemático es:

pH = 3,08 + 0,0025*Temperatura - 0,4*Polen + 0,03*Temperatura*Polen

Los parámetros optimizados para pH son: 30°C de temperatura y 0.20% de adición de polen, para obtener un valor optimo de 3.255 de pH.

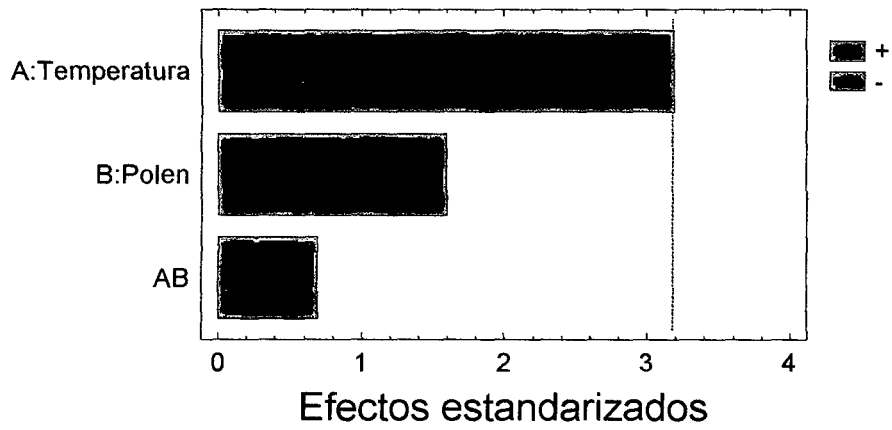


Figura 09. Grafico de Pareto para pH

En la Figura 09. Grafico de Pareto para pH se muestra que el factor temperatura se encuentra cercano a la línea de límite óptimo, se asevera que la temperatura tiene influencia significativa en el pH de la hidromiel.

Del resultado de los análisis estadísticos se asevera, que en la producción de etanol estadísticamente la temperatura tiene influencia significativa, sin embargo en la acidez de la hidromiel se observa poco afectado por la temperatura, no tiene influencia significativa, además se asevera, en la variable de respuesta del pH de la hidromiel la temperatura tiene influencia significativa en mayor consideración que el polen.

Tabla 16. Influencia de la temperatura y polen en las características sensoriales de la hidromiel producido con (*Saccharomyces sp.)*

Atributos sensoriales	Muestras /puntuaciones			
	M432	M648	M345	M891
Color Amarillo Pálido	15,9	18,6	17,8	20,9
Intensidad de Aroma	16,8	18,3	23,4	21,7
Sabor Agrio	14,6	13,3	21,1	16,3
Sabor a Levadura	13,1	14,7	14,5	14,2
Sabor Alcohólico	18,0	18,0	23,3	23,4
Sabor a Miel	20,1	20,9	19,1	21,7
Sabor a Polen	13,7	15,8	14,0	18,2
Aceptabilidad General	27,3	25,1	17,4	25,5

Fuente: Elaboración propia

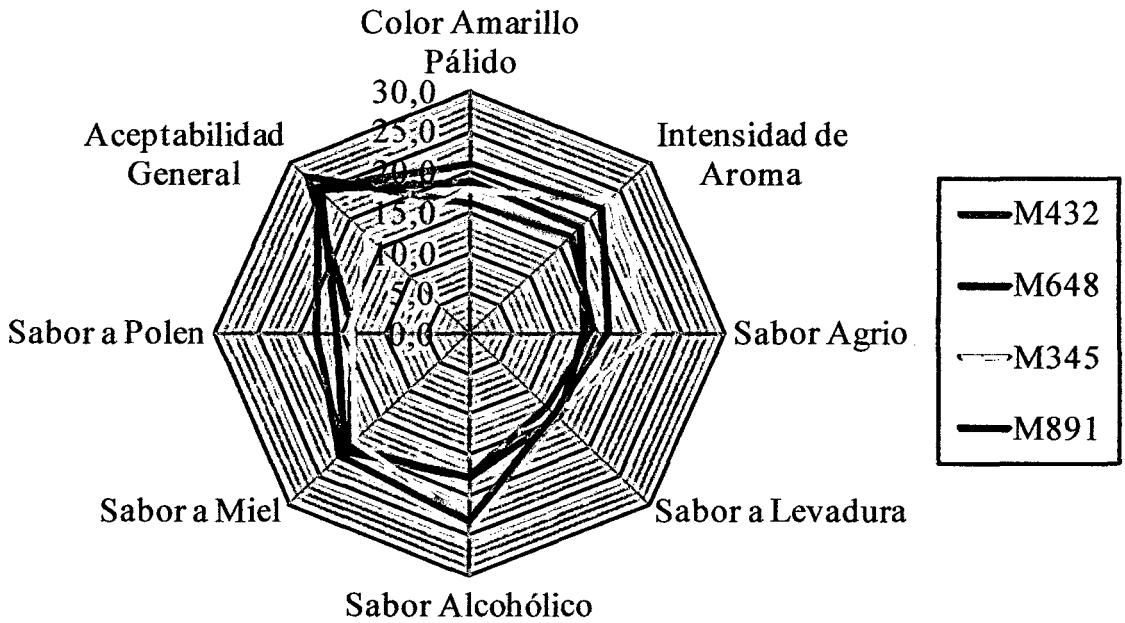


Figura 10. Efecto de temperatura y polen en el análisis sensorial de la hidromiel

La temperatura y la adición de polen tuvieron una influencia en la evaluación sensorial de la hidromiel, la muestra (M432) tuvo mayor aceptabilidad, además dicha muestra es preponderante en el sabor a miel y reducido sabor agrio, levadura y alcohólico, la muestra con mejores características y aceptabilidad, se fermento a 20° C y con 0,10% de adición de polen; la muestra que tuvo aceptabilidad luego de (M432) fue la muestra (M648), esta muestra se fermento a 20°C y con 0.20% de adición de polen.

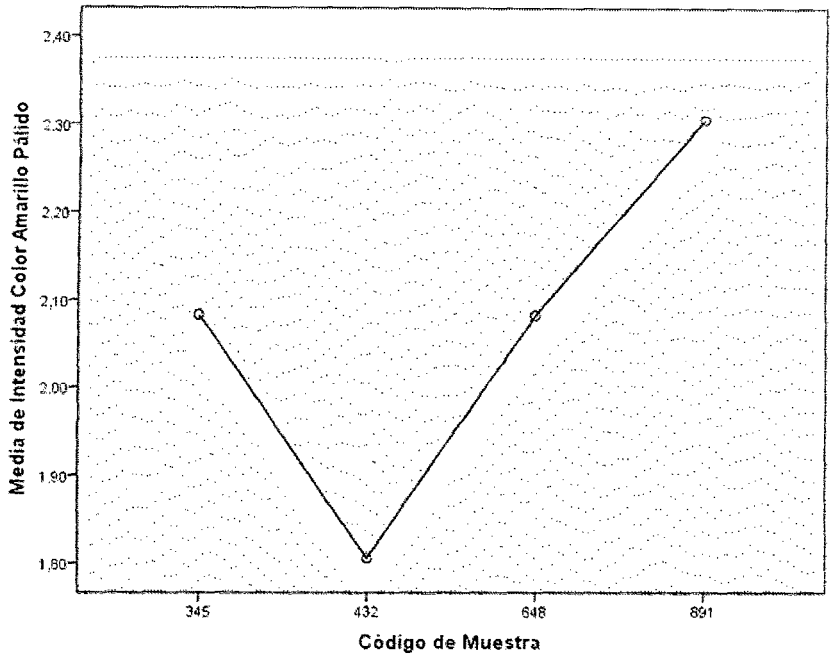


Figura 11. Media de la intensidad del color amarillo

La figura muestra la media de la intensidad de color amarillo, la muestra 891 tiene intensidad de color amarillo preponderante en comparación del resto de las muestras, la muestra 891 se preparó con una concentración de 0,20% de adición de polen, y se fermentó a 30 °C.

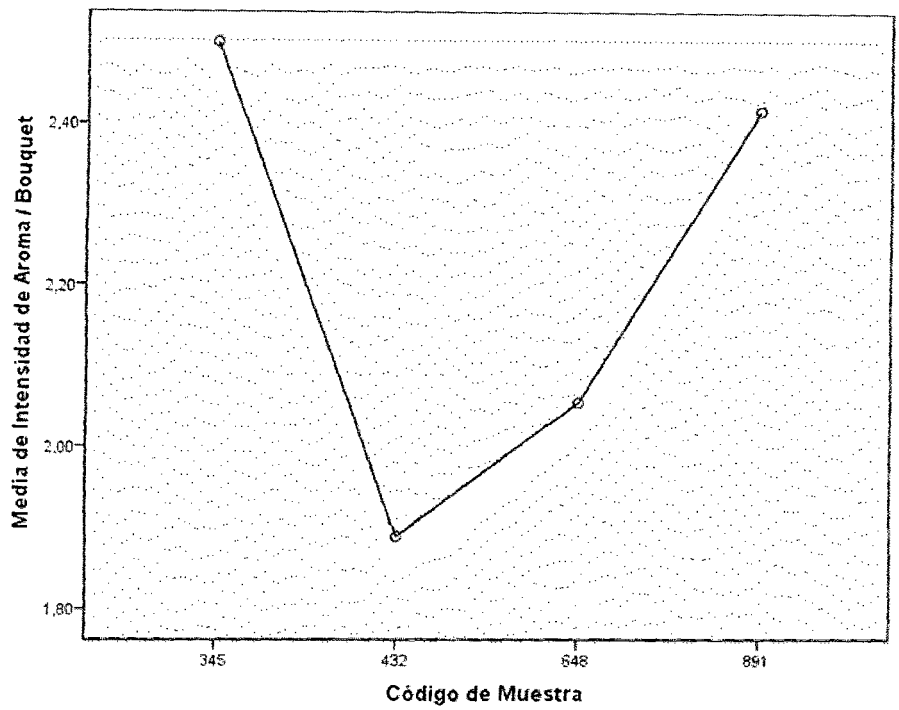


Figura 12. media de la intensidad de aroma / bouquet

La figura indica que la muestra 345 tiene una media de intensidad elevada en comparación a otras muestras, dicha muestra se preparó con 0,10% de adición de polen como fuente de nutrientes para las levaduras y fue fermentado a 30°C.

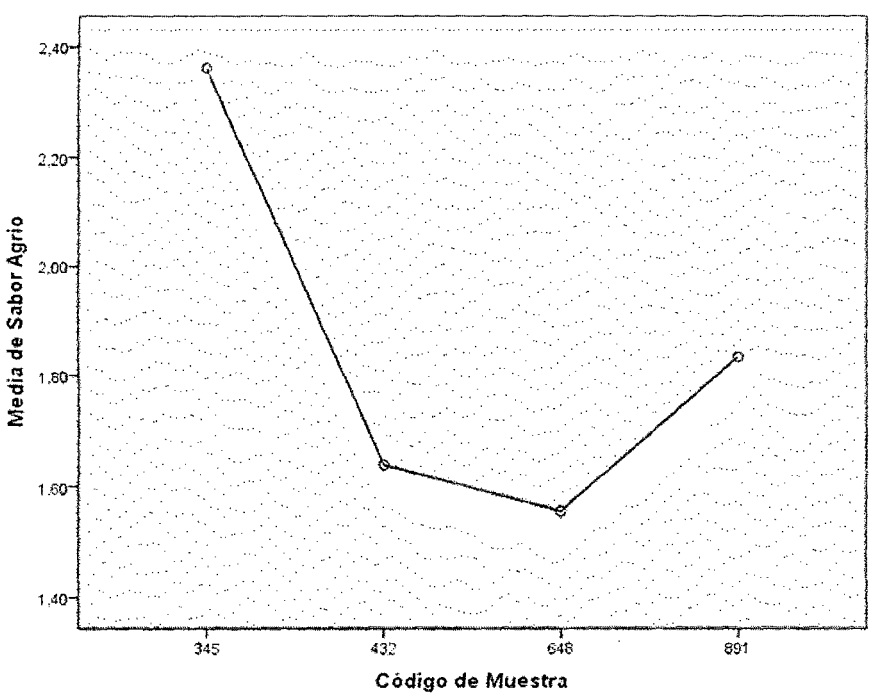


Figura 13. media de la intensidad de sabor agrio

La figura 13 indica que la muestra 345 es preponderante en el sabor agrio, dicha muestra se obtuvo con 0,10% de adición de polen como fuente de nutrientes para las levaduras y fue fermentado a 30°C

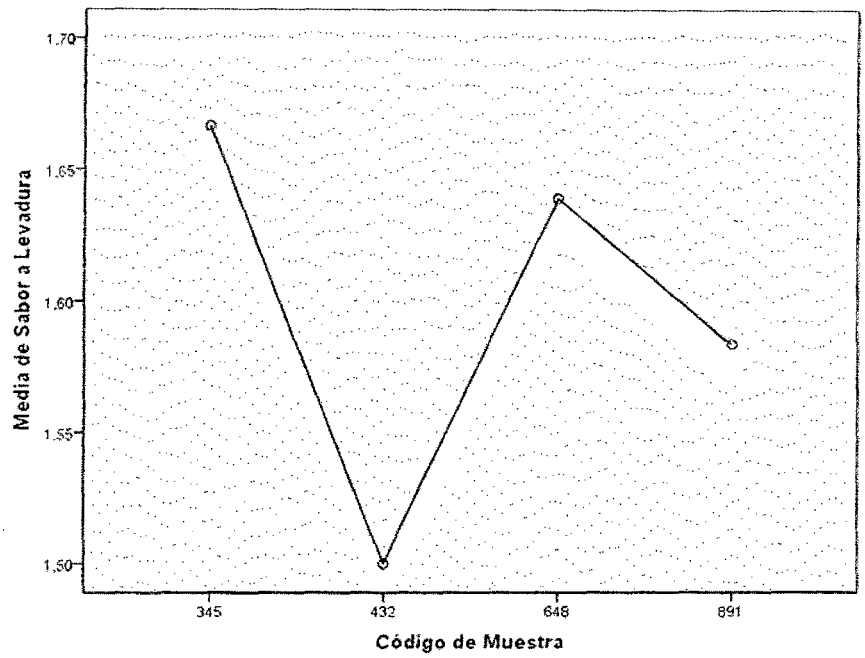


Figura 14. media de la intensidad de sabor a levadura

En la figura se demuestra que el codigo 345 indica media elevada en sabor a levadura, en comparacion a otras muestras, la muestra 345 se obtuvo con 0,10% de adición de polen como fuente de nutrientes para las levaduras y fue fermentado a 30°C

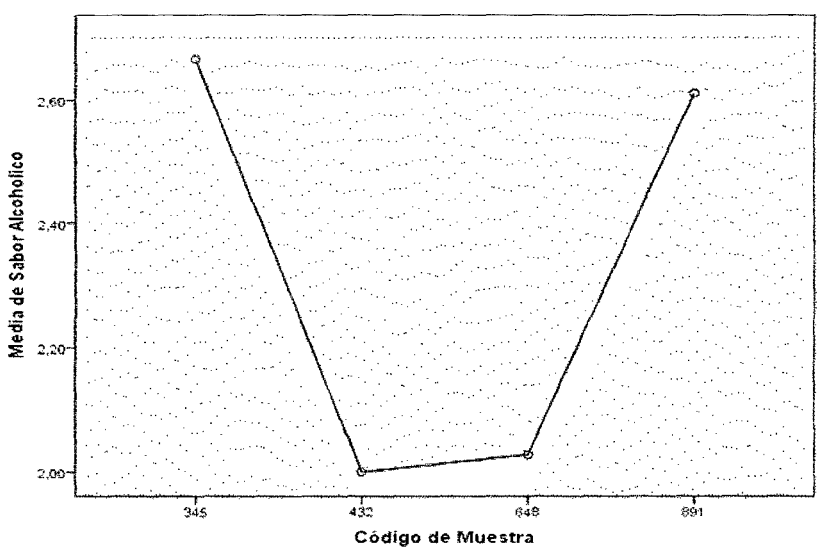


Figura 15. media de la intensidad de sabor alcohólico

La figura 15 se demuestra que el código 345 tiene intensidad de sabor alcohólico mayor que otras muestras, dicha muestra se obtuvo con 0,10% de adición de polen y fue fermentado a 30°C

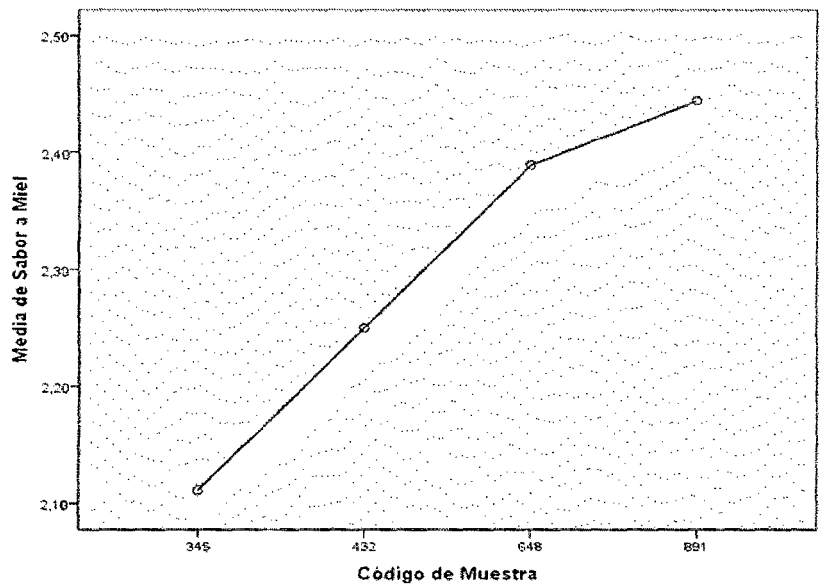


Figura 16. media de la intensidad de sabor a miel de abeja

En la figura se observa que la muestra con codigo 891 es preponderante en el sabor a miel de abeja, el cual se obtuvo con una concentración de 0,20% de adición de polen, y se fermentó a 30 °C.

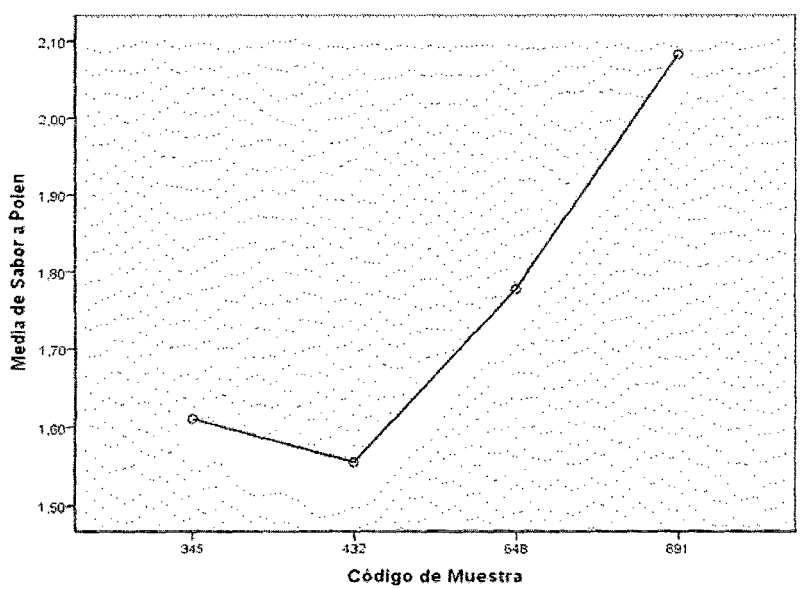


Figura 17. media de la intensidad de sabor a polen

En la figura 17 se observa que la muestra 891 obtenido con una concentración de 0,20% de adición de polen, y se fermentado a 30 °C tiene mayor intensidad de sabor, en comparación de otras muestras.

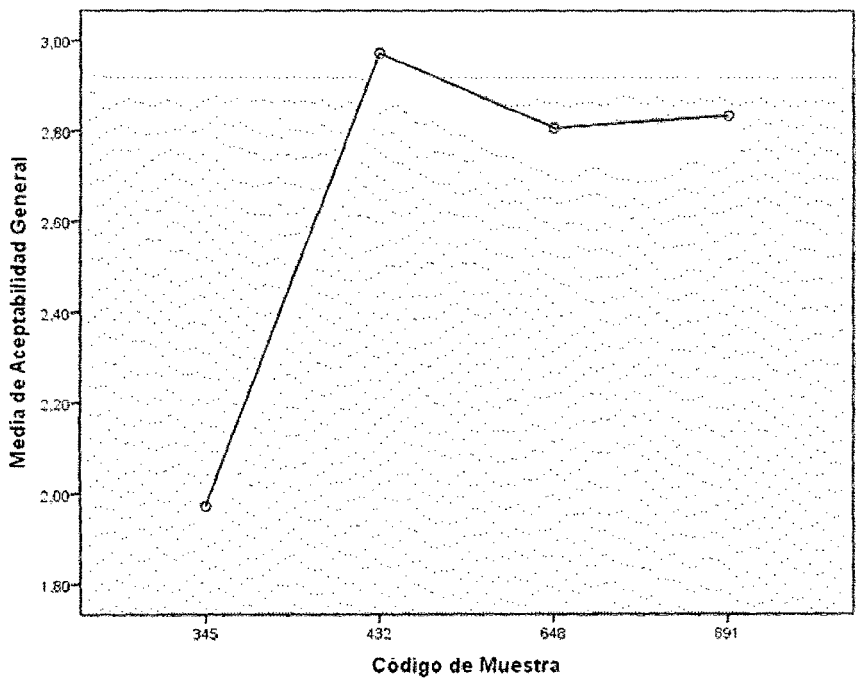


Figura 18. media de la intensidad de aceptabilidad general

La figura muestra que el código 432 posee mayor aceptabilidad que el resto de las muestras, dicha muestra se obtuvo con una concentración de 0,10% de adición de polen y fue fermentada a 20°C.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que los resultados del análisis fisicoquímico de la miel de abeja se encuentran dentro de los márgenes recomendados por la norma ITINTEC (1980) y CODEX ALIMENTARIOS, siendo los azucares reductores 70,79 ± 0,098 %, la humedad 17,53 ± 0,081 %, ceniza 0,45 ± 0,031 % y un índice diastásico de 4,53 ± 0,076.

2. Realizado el análisis fisicoquímico de la hidromiel obtenida, se encontró valores dentro de los estándares recomendados por la norma ITINTEC (1985) de la elaboración de los vinos, siendo etanol entre los valores que oscilan de 10 a 12,8 % de etanol, y la acidez se encuentra 0,31% como máximo.

3. La temperatura de fermentación para la obtención de hidromiel a 30° C. influye significativamente en la producción de etanol y pH, siendo el valor de etanol máximo alcanzado 12,8 % y pH máximo de 3,29.

4. La concentración de 0,20% de polen en la obtención de hidromiel por fermentación alcohólica de la miel de abeja influye significativamente en la producción de etanol, produciendo un óptimo de 12,35%.

5. Del análisis sensorial se desprende que: para obtener una hidromiel de características de un color amarillo pálido intenso debe elaborarse con una concentración de 0,20% de adición de polen y fermentar a 30 °C, mientras tanto para obtener hidromiel con aroma intenso elaborar con 0,10% de adición de polen y fermentar a 30°C, para obtener hidromiel con reducido tenor en sabor agrio fermentar con una concentración de 0,20% de polen y fermentar a 20°C.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la identificación de la especie de la cepa de levadura aislada del nicho natural de la miel de abeja, puesto que tiene resultados óptimos en la fermentación del mosto de miel.

2. Realizar aislamiento de varias cepas de levadura del nicho natural y evaluar la fermentabilidad y adaptación en mosto de miel de abeja para la producción de hidromiel.

3. Realizar la comparación de fermentabilidad de la levadura nativa aislada, en mosto de miel de abeja, con otras levaduras comerciales como la *Saccharomyces cerevisiae*

4. Utilizar productos naturales en la obtención de hidromiel, como el polen, clarificado natural, de esta manera reducir el uso de aditivos químicos y producir hidromiel con características fisicoquímico y sensorial aceptable.

5. Realizar la optimización del proceso productivo encontrado en este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anzaldúa, A. (1994) "La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la teoría y la practica", Editorial acribia, Zaragoza España.

2. Alberti, F. (2005) "Elaboración de Vinos Naturales" 2da. Edición, Editorial Maxtor, Barcelona España.

3. Bertello J. (2001) "Hidromiel: de la miel, el vino" Artículo, Buenos Aires - Argentina.

4. Bremond, E. (1966) "Técnicas Modernas de Vinificación de Conservación de vinos" 1ra. Edición, Barcelona, España.

5. Caillas, A. (1979) "los hidromieles de Grands Crus" sindicato nacional de apicultores, Paris – Francia.

6. Culbertson J. D., Duncan S., Guerrero I. (2006) "Handbook of Food Science, Technology and Engineering" Editorial Advisory Board; Volume I, EEUU.

7. Díaz, J. C. (2004) "Apiterapia Hoy" 1° ed. Buenos Aires - Argentina.

8. Espinoza, E. (2004) "Evaluación Sensorial de los Alimentos" segunda edición, Tacna- Perú.

9. FAO (1996), "VALUE-ADDED PRODUCTS FROM BEEKEEPING", Bulletin No. 124, Roma, Italia, ISBN 92-5-103819-8

10. Gastoni, W. (2005) "Tecnología de Bebidas" 1ra. Edi. Sau Paulo Brasil.

11. García, A.; Chirinos, V. (2003) "Manual técnico de producción de Apicultura" Instituto Superior de Tecnologías Agrarias, Lima - Perú.

12. ITINTEC, (1980) Norma Técnica Nacional N° 209. 168 de la Miel de Abejas: Definición, Clasificación y Requisitos, Lima – Perú.

13. Jerkovic, I., Kasum, A., Marijanovic, Z., Tuberoso, G., (2010). "Contribution to the characterisation of honey-based Sardinian product abbamele: Volatile aroma composition, honey marker compounds and antioxidant activity", journal of Food Chemistry 124. 401–410.

14. Layens, M., Borner, M. (2008) "Curso Completo de Apicultura" edit. Maxtor, Barcelona España.

15. Lorenzen, K, (1981) "Making a Drink fit to serve the gods. And your Friends" Rivadavia, Argentina.

16. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. "Biología de microorganismos" décima edición.

17. Mas, A. Torija, M. Beltrán, M. (2006) "Selección de Levaduras" Revista, Alfa editores técnicos, Facultad de Enología de Tarragona, Universidad Rovira y Virgili - México.

18. Mesas, J. M.; Alegre, M. T., (1999) "El Papel de los Microorganismos en la Elaboración del Vino" Articulo *Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol. 2 Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Lugo - España.

19. Mossel, A. y Quevedo, F. (1967) "Control Microbiológico de los Alimentos" U.N.M.S.M. Lima - Perú.

20. Murray, R.; Granner, D.; Mayes, P. y Rodwell, V. (1988) "Bioquímica de Harper" Undécima edición, Editorial el Manual Moderno, S. A. México.

21. Pérez, L. (1996) "Obtención de Hidromiel Utilizando Células Inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126" Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas, Ayacucho – Perú.

22. Pérez, S. y Alcántara, D. (1979) "Fermentaciones Industriales" Tomo I, casa editora la confianza, Lima - Perú.

23. Pereira, A,. Días, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., Estevinho, L., (2009). Mead production: Selection and characterization assays of Saccharomyces cerevisiae strains". Journal Food and Chemical Toxicology 47. 2057–2063

24. Peynaud, E., Blouin, J. (2003) "Enología Práctica: Conocimiento y Elaboración del Vino" 4ta. Edición, edit. Aedos. Madrid España.

25. Prost, J. (2006) "Apicultura: conocimiento de la abeja, manejo de la colmena" 4ta. Edición, ediciones mundi prensa, Madrid España.

26. Regodón, J. (2003) "Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de Levaduras para la Elaboración Estandarizada de Vinos de Calidad" Tesis, Departamento de Biología y Producción de los Vegetales, Universidad de Extremadura, España.

27. Resurrección, J. (1988) "Factibilidad Técnica de Elaboración de Hidromiel" Tesis, Facultad de Industrias Alimentarias UNALM, Lima – Perú.

28. Ribéreau, P. (2003) "Tratado de Enología" editorial hemisferio sur S. A. tomo I, Buenos Aires Argentina.

29. Ricciardelli, G. Piana, G. (1989) "La Miel" Paginas 12 – 19.

30. Rinaldi, A. Pailhe, L., Popolizio, E. (1971) "estudio analítico de mieles tucumanas" sección de publicaciones de la facultad de Agronomía y zootecnia. Tucumán, Argentina.

31. Root, A. (1974) "ABC y XYZ de la Apicultura" Editorial Modernpress S. R. L. Buenos Aires, Argentina.

32. Roldán, A., Muiswinkel, V., Lasanta, C., Palacios, V., Caro, I., (2010). Infuence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics, journal Food Chemistry 126. 574–582

33. Ruiz, M.; Martínez, M (1997) "Curso Popular de Cata de Vinos", Primera edición, la Rioja.

34. Snowdon, J.A., Cliverb, D., (1996). Microorganisms in honey, International Journal of Food Microbiology 31. 1 – 26.

35. Sroka, P., Tuszynski, T., (2006). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation, journal Food Chemistry 104. 1250–1257.

ANEXOS

ANEXO 01. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL HIDROMIEL

Tabla 17. Efectos estimados para Etanol

```
---------------------------------------------------------------
promedio       = 11,1125 +/- 0,144878
A:Temperatura  = 0,925   +/- 0,289756
B:Polen        = 1,275   +/- 0,289756
AB             = 0,275   +/- 0,289756
bloque         = 0,875   +/- 0,289756
---------------------------------------------------------------
Los errores estándar están basados en un error total con 3 g.l.
```

Esta tabla muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones. También se muestra el error normal de cada uno de los efectos, el cual mide su error de muestreo. Trazar las estimaciones.

Tabla 18. Coeficiente de regresión para Etanol

```
---------------------------------------------------------------
constante        = 8,95
A:Temperatura   = 0,01
B:Polen         = -1,0
AB              = 0,55
---------------------------------------------------------------

Etanol = 8,95 + 0,01*Temperatura - 1,0*Polen + 0,55*Temperatura*Polen
```

Tabla 19. Resultados de la Estimación para Etanol

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95,0% CL para la Media	Sup. 95,(para la M
1	11,9	11,9125	10,8815	12,
2	10,4	10,7125	9,68152	11,
3	10,3	10,3625	9,33152	11,
4	10,1	9,7125	8,68152	10,
5	12,8	12,7875	11,7565	13,
6	11,9	11,5875	10,5565	12,
7	11,3	11,2375	10,2065	12,
8	10,2	10,5875	9,55652	11,

La matriz de correlación muestra la magnitud de la confusión entre los efectos. Un perfecto diseño ortogonal mostrará una matriz.

Tabla 20. Respuesta Optimizada

```
--------------------
Meta: maximizar Etanol

Valor Optimo = 12,35

Factor                Inferior          Mayor             Optimo
-----------------------------------------------------------------
Temperatura           20,0              30,0              30,0
Polen                 0,1               0,2               0,2
```

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que maximizar Etanol.

Tabla 21. Efectos estimados para Acidez

```
-----------------------------------------------------------------
promedio       = 0,2675 +/- 0,00873928
A:Temperatura = -0,04  +/- 0,0174786
B:Polen        = 0,0065 +/- 0,0174786
AB             = 0,0115 +/- 0,0174786
bloque         = 0,001  +/- 0,0174786
-----------------------------------------------------------------
Los errores estándar están basados en un error total con 3 g.l.
```

Esta tabla muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones.

Tabla 22. Coeficiente de regresión para Acidez

```
-----------------------------------------------------------------
constante        = 0,444
A:Temperatura   = -0,00745
B:Polen         = -0,51
AB              = 0,023
-----------------------------------------------------------------


Acidez = 0,444 - 0,00745*Temperatura - 0,51*Pole
         0,023*Temperatura*Polen
```

Tabla 23. Resultados de la Estimación para Acidez

```
-----------------------------------------------------------------
            Observados        Ajustados  Inf.  95,0% CL  Sup.  95,(
Fila             Valor            Valor   para la Media   para la N
-----------------------------------------------------------------
     1           0,249            0,256        0,19381         0,3
     2           0,306           0,2845        0,22231         0,3
     3           0,243            0,238        0,17581         0,3
     4            0,27           0,2895        0,22731         0,3
     5           0,264            0,257        0,19481         0,3
     6           0,264           0,2855        0,22331         0,3
     7           0,234            0,239        0,17681         0,3
     8            0,31           0,2905        0,22831         0,3
-----------------------------------------------------------------
```

Tabla 24. Respuesta Optimizada

```
--------------------
Meta: maximizar Acidez

Valor Optimo = 0,29

Factor                Inferior          Mayor             Optimo
-----------------------------------------------------------------------
Temperatura           20,0              30,0              20,0
Polen                 0,1               0,2               0,1
```

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que maximiza Acidez.

Tabla 25. Efectos estimados para pH

```
-----------------------------------------------------------------------
promedio       = 3,195 +/- 0,0109924
A:Temperatura  = 0,07  +/- 0,0219848
B:Polen        = 0,035 +/- 0,0219848
AB             = 0,015 +/- 0,0219848
bloque         = 0,05  +/- 0,0219848
-----------------------------------------------------------------------
Los errores estándar están basados en un error total con 3 g.l.
```

Tabla 26. Coeficiente de regresión para pH

```
-----------------------------------------------------------------
constante        = 3,08
A:Temperatura    = 0,0025
B:Polen          = -0,4
AB               = 0,03
-----------------------------------------------------------------
```

pH = 3,08 + 0,0025*Temperatura - 0,4*Polen + 0,03*Temperatura*Polen

Tabla 27. Resultados de la Estimación para pH

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95,0% CL para la Media	Sup. 95,0% CL para la Media
1	3,22	3,23	3,15178	3,30822
2	3,17	3,145	3,06678	3,22322
3	3,19	3,18	3,10178	3,25822
4	3,1	3,125	3,04678	3,20322
5	3,29	3,28	3,20178	3,35822
6	3,17	3,195	3,11678	3,27322
7	3,22	3,23	3,15178	3,30822
8	3,2	3,175	3,09678	3,25322

Tabla 28. Respuesta Optimizada

```
--------------------
Meta: maximizar pH

Valor Optimo = 3,255

Factor                Inferior          Mayor             Optir
-----------------------------------------------------------------
Temperatura           20,0              30,0              30,0
Polen                 0,1               0,2               0,2
```

ANEXO 02. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL

Tabla 29. Anova de un factor para atributos sensoriales

Descriptivos

			N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Varianza entre componentes
							Límite inferior	Límite superior			
Intensidad Color Amarillo Pálido	345		9	2,0833	,79057	,26352	1,4756	2,6910	1,00	3,75	
	432		9	1,8056	,70465	,23488	1,2639	2,3472	,75	3,00	
	648		9	2,0833	1,03078	,34359	1,2910	2,8757	,25	3,50	
	891		9	2,3056	,98249	,32750	1,5504	3,0608	1,00	3,50	
	Total		36	2,0694	,86728	,14455	1,7760	2,3629	,25	3,75	
	Modelo	Efectos fijos			,88731	,14789	1,7682	2,3707			
		Efectos aleatorios				,14789[a]	1,5988[a]	2,5401[a]			-,04556
Intensidad de Aroma / Bouquet	345		9	2,5000	,81009	,27003	1,8773	3,1227	1,50	3,25	
	432		9	1,8889	,89365	,29788	1,2020	2,5758	,75	3,50	
	648		9	2,0556	,76830	,25610	1,4650	2,6461	1,25	3,25	
	891		9	2,4167	,88388	,29463	1,7373	3,0961	1,25	4,25	
	Total		36	2,2153	,84336	,14056	1,9299	2,5006	,75	4,25	
	Modelo	Efectos fijos			,84059	,14010	1,9299	2,5006			
		Efectos aleatorios				,14539	1,7526	2,6780			,00604
Sabor Agrio	345		9	2,3611	1,27544	,42515	1,3807	3,3415	,50	4,50	
	432		9	1,6389	,58778	,19593	1,1871	2,0907	,75	2,75	
	648		9	1,5556	,77840	,25947	,9572	2,1539	,25	2,75	
	891		9	1,8333	,78062	,26021	1,2333	2,4334	1,00	3,25	
	Total		36	1,8472	,91080	,15180	1,5391	2,1554	,25	4,50	
	Modelo	Efectos fijos			,89268	,14878	1,5442	2,1503			
		Efectos aleatorios				,18091	1,2715	2,4230			,04237
Sabor a Levadura	345		9	1,6667	,90139	,30046	,9738	2,3595	,50	3,00	
	432		9	1,5000	,96825	,32275	,7557	2,2443	,25	3,00	
	648		9	1,6389	,79167	,26389	1,0304	2,2474	,50	3,25	
	891		9	1,5833	,87500	,29167	,9107	2,2559	,50	2,50	
	Total		36	1,5972	,84995	,14166	1,3096	1,8848	,25	3,25	
	Modelo	Efectos fijos			,88634	,14772	1,2963	1,8981			
		Efectos aleatorios				,14772[a]	1,1271[a]	2,0673[a]			-,08189

Sabor Alcoholico	345		9	2,6667	1,06800	,35600	1,8457	3,4876	1,50	4,00	
	432		9	2,0000	1,01550	,33850	1,2194	2,7806	,75	4,00	
	648		9	2,0278	,97183	,32394	1,2808	2,7748	,25	3,25	
	891		9	2,6111	,71928	,23976	2,0582	3,1640	1,75	4,00	
	Total		36	2,3264	,96514	,16086	1,9998	2,6529	,25	4,00	
	Modelo	Efectos fijos			,95311	,15885	2,0028	2,6500			
		Efectos aleatorios				,18087	1,7508	2,9020			,02992
Sabor a Miel	345		9	2,1111	1,03162	,34387	1,3181	2,9041	1,25	4,00	
	432		9	2,2500	,69597	,23199	1,7150	2,7850	1,25	3,50	
	648		9	2,3889	,96105	,32035	1,6502	3,1276	1,00	3,75	
	891		9	2,4444	,80795	,26932	1,8234	3,0655	1,25	3,50	
	Total		36	2,2986	,85528	,14255	2,0092	2,5880	1,00	4,00	
	Modelo	Efectos fijos			,88388	,14731	1,9985	2,5987			
		Efectos aleatorios				,14731[a]	1,8298[a]	2,7674[a]			-,06449
Sabor a Polen	345		9	1,6111	,87599	,29200	,9378	2,2845	,00	2,25	
	432		9	1,5556	,99041	,33014	,7943	2,3168	,50	3,00	
	648		9	1,7778	,97983	,32661	1,0246	2,5309	,25	3,50	
	891		9	2,0833	,85696	,28565	1,4246	2,7420	,50	3,25	
	Total		36	1,7569	,91121	,15187	1,4486	2,0653	,00	3,50	
	Modelo	Efectos fijos			,92773	,15462	1,4420	2,0719			
		Efectos aleatorios				,15462[a]	1,2649[a]	2,2490[a]			-,03937
Aceptabilidad General	345		9	1,9722	,60524	,20175	1,5070	2,4375	1,25	3,00	
	432		9	2,9722	1,06393	,35464	2,1544	3,7900	,75	4,00	
	648		9	2,8056	1,16443	,38814	1,9105	3,7006	1,25	4,50	
	891		9	2,8333	,81009	,27003	2,2106	3,4560	1,75	4,00	
	Total		36	2,6458	,98084	,16347	2,3140	2,9777	,75	4,50	
	Modelo	Efectos fijos			,93681	,15613	2,3278	2,9639			
		Efectos aleatorios				,22748	1,9219	3,3698			,10947

a. Advertencia: La varianza entre componentes es negativa. Ha sido reemplazada por 0,0 al calcular esta medida para los efectos aleatorios.

Tabla 30. Prueba de homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Intensidad Color Amarillo Pálido	,995	3	32	,408
Intensidad de Aroma / Bouquet	,116	3	32	,950
Sabor Agrio	2,935	3	32	,048
Sabor a Levadura	,377	3	32	,770
Sabor Alcoholico	,661	3	32	,582
Sabor a Miel	,954	3	32	,426
Sabor a Polen	,119	3	32	,948
Aceptabilidad	1,395	3	32	,262

Tabla 31. Anova de atributos sensoriales

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intensidad Color Amarillo Pálido	Inter-grupos	1,132	3	,377	,479	,699
	Intra-grupos	25,194	32	,787		
	Total	26,326	35			
Intensidad de Aroma / Bouquet	Inter-grupos	2,283	3	,761	1,077	,373
	Intra-grupos	22,611	32	,707		
	Total	24,894	35			
Sabor Agrio	Inter-grupos	3,535	3	1,178	1,479	,239
	Intra-grupos	25,500	32	,797		
	Total	29,035	35			
Sabor a Levadura	Inter-grupos	,146	3	,049	,062	,980
	Intra-grupos	25,139	32	,786		
	Total	25,285	35			
Sabor Alcoholico	Inter-grupos	3,533	3	1,178	1,296	,293
	Intra-grupos	29,069	32	,908		
	Total	32,602	35			
Sabor a Miel	Inter-grupos	,602	3	,201	,257	,856
	Intra-grupos	25,000	32	,781		
	Total	25,602	35			
Sabor a Polen	Inter-grupos	1,519	3	,506	,588	,627
	Intra-grupos	27,542	32	,861		
	Total	29,061	35			
Aceptabilidad General	Inter-grupos	5,589	3	1,863	2,123	,117
	Intra-grupos	28,083	32	,878		
	Total	33,672	35			

Tabla 32. prueba post hoc

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) Código de Muestra	(J) Código de Muestra	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Intensidad Color Amarillo Pálido	345	432	,27778	,41828	,910	-,8555	1,4111
		648	,00000	,41828	1,000	-1,1333	1,1333
		891	-,22222	,41828	,951	-1,3555	,9111
	432	345	-,27778	,41828	,910	-1,4111	,8555
		648	-,27778	,41828	,910	-1,4111	,8555
		891	-,50000	,41828	,634	-1,6333	,6333
	648	345	,00000	,41828	1,000	-1,1333	1,1333
		432	,27778	,41828	,910	-,8555	1,4111
		891	-,22222	,41828	,951	-1,3555	,9111
	891	345	,22222	,41828	,951	-,9111	1,3555
		432	,50000	,41828	,634	-,6333	1,6333
		648	,22222	,41828	,951	-,9111	1,3555
Intensidad de Aroma / Bouquet	345	432	,61111	,39626	,425	-,4625	1,6847
		648	,44444	,39626	,679	-,6292	1,5181
		891	,08333	,39626	,997	-,9903	1,1569
	432	345	-,61111	,39626	,425	-1,6847	,4625
		648	-,16667	,39626	,975	-1,2403	,9069
		891	-,52778	,39626	,550	-1,6014	,5458
	648	345	-,44444	,39626	,679	-1,5181	,6292
		432	,16667	,39626	,975	-,9069	1,2403
		891	-,36111	,39626	,799	-1,4347	,7125
	891	345	-,08333	,39626	,997	-1,1569	,9903
		432	,52778	,39626	,550	-,5458	1,6014
		648	,36111	,39626	,799	-,7125	1,4347

Sabor Agrio	345	432	,72222	,42081	,332	-,4179	1,8624
		648	,80556	,42081	,242	-,3346	1,9457
		891	,52778	,42081	,598	-,6124	1,6679
	432	345	-,72222	,42081	,332	-1,8624	,4179
		648	,08333	,42081	,997	-1,0568	1,2235
		891	-,19444	,42081	,967	-1,3346	,9457
	648	345	-,80556	,42081	,242	-1,9457	,3346
		432	-,08333	,42081	,997	-1,2235	1,0568
		891	-,27778	,42081	,911	-1,4179	,8624
	891	345	-,52778	,42081	,598	-1,6679	,6124
		432	,19444	,42081	,967	-,9457	1,3346
		648	,27778	,42081	,911	-,8624	1,4179
Sabor a Levadura	345	432	,16667	,41782	,978	-,9654	1,2987
		648	,02778	,41782	1,000	-1,1043	1,1598
		891	,08333	,41782	,997	-1,0487	1,2154
	432	345	-,16667	,41782	,978	-1,2987	,9654
		648	-,13889	,41782	,987	-1,2709	,9931
		891	-,08333	,41782	,997	-1,2154	1,0487
	648	345	-,02778	,41782	1,000	-1,1598	1,1043
		432	,13889	,41782	,987	-,9931	1,2709
		891	,05556	,41782	,999	-1,0765	1,1876
	891	345	-,08333	,41782	,997	-1,2154	1,0487
		432	,08333	,41782	,997	-1,0487	1,2154
		648	-,05556	,41782	,999	-1,1876	1,0765

Sabor Alcoholico	345	432	,66667	,44930	,459	-,5507	1,8840
		648	,63889	,44930	,495	-,5784	1,8562
		891	,05556	,44930	,999	-1,1618	1,2729
	432	345	-,66667	,44930	,459	-1,8840	,5507
		648	-,02778	,44930	1,000	-1,2451	1,1895
		891	-,61111	,44930	,533	-1,8284	,6062
	648	345	-,63889	,44930	,495	-1,8562	,5784
		432	,02778	,44930	1,000	-1,1895	1,2451
		891	-,58333	,44930	,571	-1,8007	,6340
	891	345	-,05556	,44930	,999	-1,2729	1,1618
		432	,61111	,44930	,533	-,6062	1,8284
		648	,58333	,44930	,571	-,6340	1,8007
Sabor a Miel	345	432	-,13889	,41667	,987	-1,2678	,9900
		648	-,27778	,41667	,909	-1,4067	,8511
		891	-,33333	,41667	,854	-1,4622	,7956
	432	345	,13889	,41667	,987	-,9900	1,2678
		648	-,13889	,41667	,987	-1,2678	,9900
		891	-,19444	,41667	,966	-1,3233	,9345
	648	345	,27778	,41667	,909	-,8511	1,4067
		432	,13889	,41667	,987	-,9900	1,2678
		891	-,05556	,41667	,999	-1,1845	1,0733
	891	345	,33333	,41667	,854	-,7956	1,4622
		432	,19444	,41667	,966	-,9345	1,3233
		648	,05556	,41667	,999	-1,0733	1,1845

Sabor a Polen	345	432	,05556	,43733	,999	-1,1293	1,2405
		648	-,16667	,43733	,981	-1,3516	1,0182
		891	-,47222	,43733	,704	-1,6571	,7127
	432	345	-,05556	,43733	,999	-1,2405	1,1293
		648	-,22222	,43733	,957	-1,4071	,9627
		891	-,52778	,43733	,627	-1,7127	,6571
	648	345	,16667	,43733	,981	-1,0182	1,3516
		432	,22222	,43733	,957	-,9627	1,4071
		891	-,30556	,43733	,897	-1,4905	,8793
	891	345	,47222	,43733	,704	-,7127	1,6571
		432	,52778	,43733	,627	-,6571	1,7127
		648	,30556	,43733	,897	-,8793	1,4905
Aceptabilidad General	345	432	-1,00000	,44161	,128	-2,1965	,1965
		648	-,83333	,44161	,254	-2,0298	,3632
		891	-,86111	,44161	,228	-2,0576	,3354
	432	345	1,00000	,44161	,128	-,1965	2,1965
		648	,16667	,44161	,981	-1,0298	1,3632
		891	,13889	,44161	,989	-1,0576	1,3354
	648	345	,83333	,44161	,254	-,3632	2,0298
		432	-,16667	,44161	,981	-1,3632	1,0298
		891	-,02778	,44161	1,000	-1,2243	1,1687
	891	345	,86111	,44161	,228	-,3354	2,0576
		432	-,13889	,44161	,989	-1,3354	1,0576
		648	,02778	,44161	1,000	-1,1687	1,2243

Tabla 33. Subconjuntos homogéneos de atributos sensoriales

Intensidad Color Amarillo Pálido

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
432	9	1,8056
345	9	2,0833
648	9	2,0833
891	9	2,3056
Sig.		,634

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Intensidad de Aroma / Bouquet

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
432	9	1,8889
648	9	2,0556
891	9	2,4167
345	9	2,5000
Sig.		,425

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Sabor Agrio

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
648	9	1,5556
432	9	1,6389
891	9	1,8333
345	9	2,3611
Sig.		,242

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Sabor a Levadura

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
432	9	1,5000
891	9	1,5833
648	9	1,6389
345	9	1,6667
Sig.		,978

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Sabor Alcoholico

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
432	9	2,0000
648	9	2,0278
891	9	2,6111
345	9	2,6667
Sig.		,459

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Sabor a Polen

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
432	9	1,5556
345	9	1,6111
648	9	1,7778
891	9	2,0833
Sig.		,627

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Sabor a Miel

HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
345	9	2,1111
432	9	2,2500
648	9	2,3889
891	9	2,4444
Sig.		,854

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

Aceptabilidad General

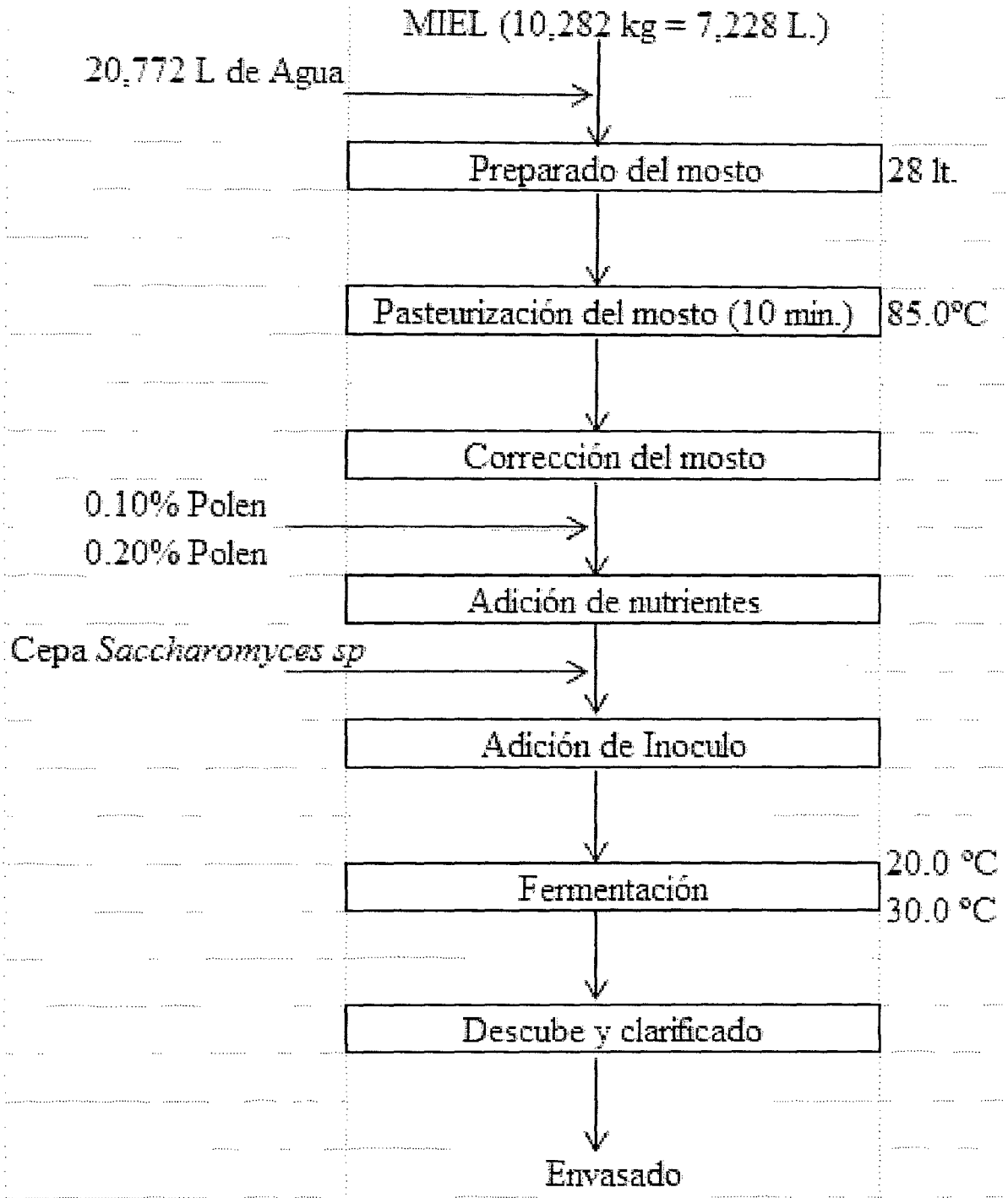
HSD de Tukey[a]

Código de Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
345	9	1,9722
648	9	2,8056
891	9	2,8333
432	9	2,9722
Sig.		,128

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9.000.

ANEXO 03. DIAGRAMA DE BLOQUES PARA ELABORACIÓN DE HIDROMIEL



ANEXO 04. NORMA TÉCNICA NACIONAL DE VINOS (ITINTEC, 1985)

1.- características organolépticas

Color : de acuerdo a su clase

Aspecto : límpido al momento de liberarse al consumo

Olor : características de su clase

Sabor : características de su clase

2.- requisitos fisicoquímicos

Titulo alcohólico mínimo en % vol.

A 20 °C – 20 °C.....10,3

Titulo alcohólico mínimo en % vol.

A 15°C – 15°C.....10,0

Con excepción a los vinos generosos (4,4):

Vinos espumantes naturales (4,5)

Vinos espumantes gasificados (4,6)

Vinos aperitivos (4,7)

Acidez acética volátil expresada en meq. /l. máxima.....30,0

Acidez acética volátil expresada en g/l. de acido acético máximo.....1,8

Cloruros, expresado como cloruro de sodio g/l. máximo.....1,0

ANEXO 05. DETERMINACIÓN DE AZUCARES: (AOAC 920.183)

En un beaker de 100 ml. Se pesa analíticamente 26 g. de muestra, se añade 50ml de agua desionizada y se disuelve la muestra, se coloca en una fiola de 100 ml dando varia lavadas al vaso, para recuperar lo posible de la muestra, se agrega 5 ml de crema alúmina y enrazar hasta volumen, invertir 20 veces, esperar a que clarifique y filtrar. (Solución A).

Determinación de azucares reductores

Se toma 7ml. (dependiendo de la muestra) de la solución A y se lleva a una fiola de 500ml, se enraza y se invierte 20 veces, esta es la solución titulante. En un matraz de 250ml, se agrega 5ml de fehling A y 5 ml de Fehling B, se mezcla y se agrega 7ml de agua desionizada, con una pastilla de agitación, se agregan 15 ml de la solución azucarada y se llevan a ebullición por 1`40``, se agregan 3 gotas de azul de metileno y se continua con la titulación hasta que el color vire a rojo ladrillo. Se toma el gasto (x). Luego se repite la operación en otro matraz de 250 ml, 5ml de Fehling A + 5ml de Fehling B + (25 – x) ml de agua desionizada + (x- 1,5) ml de solución azucarada, llevar a ebullición por 1`40``, se agrega tres gotas de azul de metileno y se continua titulando gota a gota hasta viraje a rojo ladrillo (y).

%AR = factor * D * 100/ (y*m)

D = dilución

m = peso de la muestra.

ANEXO 06. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LA MIEL

Según la norma técnica peruana NTP 209.171 del INDECOPI (1999).

Para medir el contenido de humedad de la miel se utiliza el método indirecto, por refractometría, para ello se utiliza el refractómetro de humedad 12 – 30 %, a una temperatura de 20° C. se coloca una gota de miel liquida sobre la prisma del refractómetro limpio y seco, leer inmediatamente.

ANEXO 07. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ DE MIEL: (NTP 209.174: 1999)

Pesar 10 g. de miel en un matraz de 250 ml, disolver con 75 ml. De agua desionizada, agregar 3 a 4 gotas de fenoltaleina. Titular con NaOH 0,1N hasta que torne un color ligero rosado, debe tener una persistencia de 10``. Si se utiliza pHmetro titular hasta pH 8,3.

A=10v

A = Acidez titulable

V = Gasto.

DETERMINACIÓN DE ACIDEZ DE LA MIEL: (AOAC 962.19)

En un matras de de 250 ml. Pesar 10g. de miel + 75 ml. De agua desionizada, disolver y utilizar un agitador magnético, de lo contrario disolver la muestra en un beaker de 250 ml. Y agitar con una bagueta, tomar la lectura del pH, titular con solución 0,05N de NaOH (5ml/min.) hasta pH 8,5, inmediatamente se añade 10 ml. de exceso, a continuación se titula con HCl 0,05N hasta pH 8,3.

Se reemplaza en la formula:

A = ((V+10) * N – V1N1) * 1000/m

ANEXO 08. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE DIASTASA: (MÉTODO BIANCHI)

El método Bianchi consiste en poner en contacto una solución de miel con almidón, favoreciendo su hidrólisis, la cual se determina con el empleo de yodo que reacciona con el remanente no hidrolizado.

Procedimiento:

- Pesar 2 g. de miel y mezclar con un buffer de pH 5,3 en un vaso precipitado 20 ml.
- Tomar 1 ml de la mezcla y agregar al primero de nueve tubos de ensayo que contienen 1 ml NaCl 1% cada uno.
- Extraer 1 ml del primer tubo y añadir al segundo tubo, repetir la operación hasta el noveno tubo, desechar 1 ml del noveno tubo. El décimo tubo es de testigo.
- Agregar a cada tubo 1 ml de solución de almidón 0.05% e incubar a 37°C por 30min.
- Enfriar rápidamente y añadir a cada tubo solución de yodo.
- Determinar el tubo con dilución mayor que permanece incoloro.
- Determinación del índice de diastasa según la siguiente tabla:

TUBO N°	DILUCIÓN
1	½
2	¼
3	1/8
4	1/16
5	1/32
6	1/64
7	1/128
8	1/256
9	1/512
10	TESTIGO

Los valores normales para miel deben oscilar entre 64 y 128 U.D., cantidades inferiores corresponden a mieles viejas, calentadas, mal procesadas o adulteradas.

ANEXO 09. DETERMINACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF):

(Método Bianchi)

La obtención de miel por parte de las abejas y su almacenaje en los panales conlleva al comienzo del proceso natural de envejecimiento de la miel, la determinación de HMF nos indica el grado de frescura de la miel y los tratamientos térmicos que esta ha sufrido.

Procedimiento:

- Pesar 2g de muestra (miel) y mezclar con 7ml de éter etílico en un vaso precipitado de 50 ml.
- Mezclar intensamente durante 5 minutos, para luego trasvasar a tubo de ensayo.
- Adicionar al tubo de ensayo 2 ml de solución acida resorcinol 1%.
- Dejar en reposo en un lugar oscuro, por tiempo de 10min.
- Mezclar y esperar 20 segundos y observar la estabilización de color
- Comparar con la tabla de colores Bianchi

ANEXO 10. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA HIDROMIEL

PRUEBA DESCRIPTIVA CUANTITATIVA PARA HIDROMIEL

Nombres y Apellidos: ..... **Fecha**: .../.... /.... /

Código Muestra: .....

Instrucciones: Ud. recibirá 8 muestras de HIDROMIEL rotulados, Con los descriptores sensoriales generados, mida LA INTENSIDAD de los respectivos caracteres sensoriales de la hidromiel, marcando con una línea vertical sobre la escala lineal mostrada, **NO OLVIDE ENJUAGAR SU BOCA ENTRE CADA MUESTRA,** la evaluación debe ser realizada entre intervalos de 1 minuto entre cada muestra.

Intensidad Color Amarillo	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Intensidad de Aroma/ Bouquet	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Sabor Agrio	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Sabor a levadura	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Sabor Alcohólico	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Sabor a Miel	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Sabor a Polen	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho
Aceptabilidad	0_____1_____2_____3_____4_____5 Nada Mucho

Comentarios y Sugerencias:

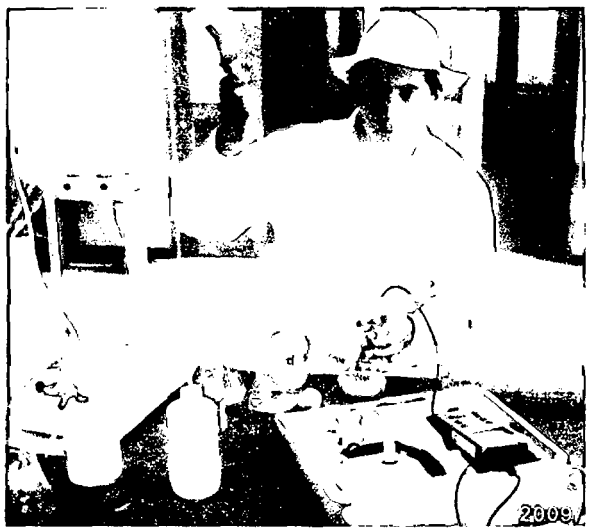
.....

.....

.....

.....

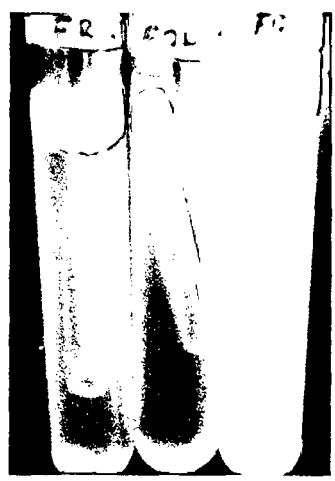
ANEXO 11. PANEL FOTOGRÁFICO EN DESARROLLO DE LA TESIS



Ajuste de pH, de solución rauling en matraz

Flameado de tubos de ensayo en repique de cepas

Siembra de cepas aisladas



Fermentabilidad

Polen a utilizar en la hidromiel