

# Establecimiento de las condiciones de elaboración de hidromiel mediante diseño de experimentos

Cristian Hernández, Amaury Blanco Martha Quicazán

## RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue determinar las condiciones de fermentación para la elaboración de hidromiel, utilizando un diseño de experimentos Plackett-Burman. Para lo anterior, se evaluaron siete factores a dos niveles. Los °Brix iniciales (20 y 24), la procedencia de la miel de abejas (Boyacá y Huila), la levadura comercial (Uvaferm® y Fermivin®), el proceso de higienización (pasterización y Metabisulfito), el suplemento de fuente de nitrógeno (Polen y di-hidrogeno fosfato de amonio), tipo de inóculo (inoculo de 48 horas o activación) y la temperatura de fermentación (20 y 30 grados Celsius) fueron los parámetros establecidos. Los medios resultantes no fueron ajustados en su pH inicial. Las condiciones de elaboración establecidas fueron: Miel proveniente de Boyacá, 24 °Brix como contenido de azúcar inicial, 30 °C como temperatura de fermentación, activando a la levadura, utilizando la pasterización, UVAFERM y polen.

**Palabras Clave**— Miel de abejas, Polen, Fuente de Nitrógeno, Apicultura.

## I. INTRODUCCIÓN

La hidromiel es una bebida alcohólica que contiene de 8 a 18% (v/v) de etanol, y se prepara fermentando la mezcla entre miel de abejas y agua. La elaboración de esta bebida toma un tiempo prolongado y la velocidad de la fermentación depende del tipo de miel utilizado, el tipo de levadura, la fuente de nitrógeno utilizada, el pH, entre otros [1]. Además, durante este tiempo, pueden ocurrir varios problemas, como retraso o detención de la fermentación, re-fermentación por parte de la levadura, incremento de la acidez volátil,

Cristian Hernández: [cyhernandezg@unal.edu.co](mailto:cyhernandezg@unal.edu.co), estudiante de Maestría en Ingeniería - Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

Amaury Blanco: [ajblancop@unal.edu.co](mailto:ajblancop@unal.edu.co), Investigador, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

Martha Quitarán: [mcquicazand@unal.edu.co](mailto:mcquicazand@unal.edu.co), Profesor asociado – Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del proyecto “Desarrollo de un modelo productivo de bebidas fermentadas de miel como estrategia para generar valor en el ámbito característico de la apicultura en Colombia” financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología, e Innovación – COLCIENCIAS.

contaminación por parte de bacterias y falta de uniformidad del producto[2].

Estos problemas pueden generarse debido al uso de levaduras inapropiadas para la composición o condiciones específicas que provee el mosto de miel, o el resultado de varias condiciones como: alto estrés osmótico, falta de nutrientes esenciales, baja concentración de minerales, bajo pH y baja capacidad buffer del medio. Entonces debido a la falta de información científica a cerca de la fermentación de mostos de miel, es acepado por los fabricantes de hidromiel que el mejoramiento de la calidad de esta bebida alcohólica incluya el desarrollo de una correcta formulación de aditivos y una optimización de las condiciones de fermentación [3].

La concentración inicial de azúcar en los mostos, determina la concentración final de alcohol en la bebida, como el tipo de hidromiel a elaborar (seco, semidulce y dulce). Además, la fermentación tiene que transcurrir a una temperatura entre 19,6 y 22,8 °C, para un adecuado proceso. Altos valores de temperatura, mayor a 32 °C, provee velocidades de fermentación no deseadas y el crecimiento de bacterias que afectan la fermentación alcohólica [4].

El dióxido sulfuroso (en forma de metabisulfito), es usado generalmente como un antioxidante y desinfectante en la industrial del vino [5], se emplea en la inhibición de bacterias acéticas y ácido lácticas [2], y es un estimulante en la utilización de aminoácidos por parte de las levaduras [6], pero también se ha establecido que el dióxido sulfuroso tiene efectos negativos en la salud humana, por esta razón se han fijado límites máximos más bajos, resultado en una disminución de su concentración en productos alimenticios y vinos [6].

La referencia [7] concluye en su trabajo, que la producción de hidromiel depende del tipo de hidromieles mejores resultados obtenidos por ellos establecen el uso de miel oscura, la cual tiene un contenido alto de minerales y un mayor nivel de pH. Además, se ha visto que se puede ahorrar tiempo en el proceso de fermentación incrementando (aumento de la productividad) la proporción de inóculo o cantidad de células de levadura suspendidas que se le agrega a un fermentador por lotes. Sin embargo un incremento en la cantidad de inóculo también puede afectar el estado de la fermentación además del perfil aromático de la bebida [8].

De esta manera, el objetivo del presente trabajo es determinar las condiciones de elaboración de hidromiel, utilizando una metodología de diseño de experimentos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Miel*

En este estudio se utilizó miel de *Apis mellifera* proveniente de apicultores involucrados con el proyecto de los departamentos de Boyacá y Huila, Colombia. Estas fueron almacenadas en refrigeración a  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , durante el tiempo de la investigación.

### *Levaduras*

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* de la marca UVAFERM BC, producida por LALLEMAD y *Saccharomyces cerevisiae* de la marca FERMIVIN producida por OENOBRAUNDS. Estos se mantuvieron en refrigeración por el tiempo de la investigación.

### *Fuentes de Nitrógeno*

Se empleó Polen proveniente Boyacá, almacenado en condiciones de refrigeración, suplementado a una concentración de 4 gramos de polen por litro de solución, equivalente a una concentración de nitrógeno de 140 mg/l. También se utilizó Fosfato di-hidrógeno de amonio (FDA) de Panreac, como suplemento de fuente de nitrógeno, este se agregó al medio en una concentración de 1,15 g/l, equivalente a una concentración de nitrógeno de 140 mg/l.

### *Preparación del mosto de miel*

Para la preparación del mosto, se tomó cada una de las mieles de diferente procedencia y se diluyeron en 684 ml agua potable comercial fijando los °Brix iniciales a 20 o 24 de acuerdo a la matriz de ensayos, con la ayuda de un refractómetro marca SinoTech Ref RSG-100/ATC. Una vez se obtuvieron las mieles diluidas, estas fueron pasadas a través de una malla, con el fin de filtrarlas. Los medios fueron suplementados con Polen o FDA de acuerdo a la matriz de ensayos. Estas se sometieron a un proceso de higienización utilizando, ya sea pasterización o sulfitación de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental. Los medios pasterizados fueron sometidos a una temperatura de  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos en baño maría; e inmediatamente después sometidos a enfriamiento rápido utilizando agua fría, hasta alcanzar una temperatura ambiente. Después de esto los mostos fueron inoculados. Los medios sometidos a sulfitación les fueron agregados metabisulfito de sodio a una concentración de 100 ppm y dejados en reposo durante 24 horas, con el fin de dejar actuar y reducir la carga bacteriana. Después de este tiempo, los mostos fueron inoculados. Todos los utensilios, frascos y envases, fueron lavados con agua y jabón y pasterizados con agua hirviendo, antes de ser utilizados.

### *Inóculos*

Para la preparación de los inóculos se evaluaron dos metodologías de acuerdo a la matriz de ensayos. La primera fue activación de la levadura. Para esto se utilizó el 10% de

medio de fermentación a los cuales se les agregó el extracto seco del microorganismo, a una concentración de 0,5 g/l; de los cultivos comerciales de *Saccharomyces UVAFERM* o *FERMIVIN* de acuerdo a la matriz de ensayos. Los mostos inoculados se incubaron a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, los medios con levadura activada, fueron transferidos al recipiente de fermentación. La segunda fue la elaboración de los inóculos, donde se tomó el 10% (90 ml) del volumen final de fermentación, a los cuales se les adicionó la levadura (*FERMIVIN* o *UVAFERM* de acuerdo a la matriz de ensayos) en una proporción de 0,5 g/l. Los inóculos se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los inóculos fueron transferidos al mosto de fermentación.

### *Fermentación*

Una vez inoculados los mostos, estos se incubaron a 20 o  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  de acuerdo a la matriz experimental, durante 25 días y sin agitación. En este tiempo se realizaron actividades de seguimiento de pH, Acidez Total, y °Brix con el fin de verificar el curso de la fermentación. Además, se determinó la cantidad inicial y final de azúcares (glucosa y fructosa), etanol, glicerol, ácido succínico y acético, mediante cromatografía líquida (HPLC).

### *Determinación de Azúcares, Glicerol, Etanol y Ácidos Orgánicos (Succínico, Acético y Láctico), mediante HPLC*

Para la determinación de azúcares (glucosa y Fructosa), glicerina y etanol, se utilizó un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 de Therm Scientific, con detector IR marca Shodex. Las condiciones de trabajo fueron: Columna Shodex SC1011, temperatura del horno  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , flujo de 0,8 ml/min, temperatura del detector  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y agua grado HPLC, como fase móvil. El tiempo de corrida fue de 30 minutos [9]. Para la determinación de Ácidos orgánicos, se utilizó el equipo mencionado anteriormente. Las condiciones de trabajo fueron: Columna Aminex HPX-87H, temperatura del horno  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , flujo de 0,7 ml/min, temperatura del detector  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y agua grado HPLC + Ácido sulfúrico 5 mM, como fase móvil. El tiempo de corrida fue de 30 minutos [10].

### *Diseño del experimentos*

Para la determinación de las condiciones de fermentación, se utilizó un diseño experimental Plackett-Burman, ya que nos permite evaluar una cantidad apreciable de factores con la ventaja de obtener un número de ensayos manejables para el experimentador y analizar los efectos principales de los factores evaluados. Se evaluaron siete factores a dos niveles como se estableció en el resumen. Para esta cantidad de factores, el diseño establece realizar 12 ensayos como se muestra en la Tabla 1. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Tabla 1. Combinación ensayos diseño de experimentos Plackett-Burman, para siete factores y sus respectivos niveles (-1 menor y +1 mayor).

Ensayo	Miel	°Brix	T. Ferment. °C	Inóculo	Higienización	Lev.	Fuente de Nitrógeno
E1	Boyacá	24	20	Inóculo 48h	Pasteurización	Fermivin	FDA
E2	Boyacá	20	30	Inóculo 48h	Pasteurización	Uvaferm	FDA
E3	Huila	24	30	Inóculo 48h	Met. Sodio	Uvaferm	FDA
E4	Boyacá	24	30	Activación	Met. Sodio	Uvaferm	Polen
E5	Boyacá	24	20	Activación	Met. Sodio	Fermivin	DAP
E6	Boyacá	20	20	Activación	Pasteurización	Uvaferm	Polen
E7	Huila	20	20	Inóculo 48h	Met. Sodio	Fermivin	Polen
E8	Huila	20	30	Activación	Pasteurización	Fermivin	FDA
E9	Huila	24	20	Inóculo 48h	Pasteurización	Uvaferm	Polen
E10	Boyacá	20	30	Inóculo 48h	Met. Sodio	Fermivin	Polen
E11	Huila	24	30	Activación	Pasteurización	Fermivin	Polen
E12	Huila	20	20	Activación	Met. Sodio	Uvaferm	FDA
Niveles							
-1	Huila	20	20	Activación	Metabisulfito	Uvaferm	FDA
1	Boyacá	24	30	Inóculo 48h	Pasteurización	Fermivin	Polen

**Análisis estadístico**

Se utilizó ANOVA a un nivel de significancia 0,05 para determinar las diferencias significativas entre los ensayos. Además se realizó una prueba de significancia de los coeficientes de regresión del modelo Plackett-Burman, para determinar la influencia de cada uno de los factores sobre las variables de respuesta, con la ayuda de la prueba t-student a un nivel de significancia de 0,05. La ecuación del modelo de regresión Plackett-Burman resultante fue el siguiente:

$$y = b_0 + b_1x_1 + bx_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + b_7x_7 \quad (1)$$

Donde y es la variable de respuesta,  $b_0$  es el coeficiente del término independiente y  $b_1, b_2, b_3, b_4, b_5, b_6, b_7$  son los coeficientes de regresión, de cada uno de los factores establecidos en el estudio (resumen), de forma respectiva. Para lo anterior como software estadístico se utilizó MATLAB y Excel.

**III. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

**Consumo de azúcares (°Brix)**

Durante el proceso de fermentación se pudo observar que los azúcares disminuyen de manera marcada durante los primeros días del proceso, estabilizándose al final Fig. 1. y Fig. 2. La referencia [11] obtiene perfiles similares a los obtenidos en el presente trabajo y reporta niveles de 10,447 °Brix al final de la fermentación. El menor contenido sólidos solubles obtenido en el presente trabajo, al final de la fermentación fue de 9,8 para un nivel inicial 24 °Brix y de 7,0 para un nivel inicial de 20 °Brix.

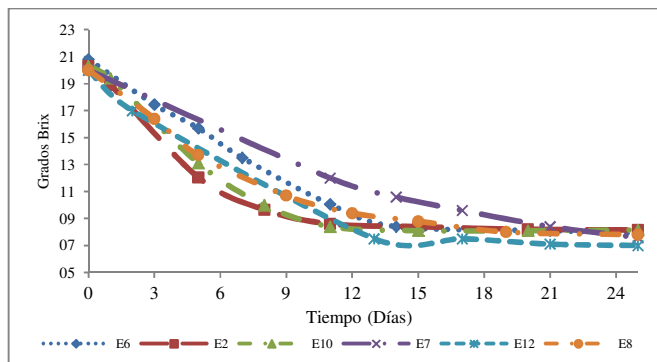


Fig 1. Disminución de los sólidos solubles totales durante la fermentación de hidromiel para un nivel inicial de 20 °Brix.

Esta diferencia es influenciada por la cantidad de etanol producida, ya que a mayor °Brix al inicio, se obtiene mayor cantidad de producto, detectable por el refractómetro.

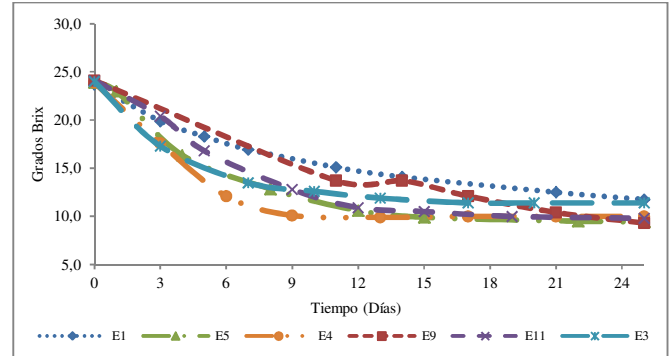


Fig 1. Disminución de los sólidos solubles totales durante la fermentación de hidromiel para un nivel inicial de 24 °Brix.

La Tabla 2 muestra la velocidad de consumo de azúcares hasta alcanzar la estabilización, además de la concentración de glucosa y fructosa al inicio y final de la fermentación. En esta podemos apreciar que los ensayos 4 y 10 muestran la mayor velocidad de consumo.

Tabla 2. Contenido de Azúcares al inicio y final de la fermentación y velocidad de consumo.

Ensayos	Glucosa g/L		Fructosa g/L		Consumo °Brix/día
	Inicio	Final	Inicio	Final	
E1	98,54 ± 0,13	2,53 ± 0,34	119,19 ± 0,3	24,53 ± 1,63	0,48 a
E2	65,76 ± 4,83	0,00	92,66 ± 3,37	0,93 ± 0,01	0,61 b
E3	105,88 ± 0,29	9,27 ± 0,28	127,6 ± 4,22	31,3 ± 1,03	0,74 c
E4	99,14 ± 0,17	0,00	122,17 ± 0,64	1,25 ± 0,01	0,82 d
E5	100,44 ± 0,6	0,00	119,88 ± 0,63	1,07 ± 0,27	0,65 b
E6	82,66 ± 0,26	0,00	101,47 ± 0,29	0,89 ± 0	0,52 a
E7	85,56 ± 0,22	0,00	112,11 ± 0,31	6,77 ± 0,28	0,50 a
E8	86,46 ± 1,63	0,00	107,01 ± 2,06	10,01 ± 0,73	0,63 b
E9	101,66 ± 1,59	0,00	134,37 ± 2,1	1,01 ± 0,14	0,60 b
E10	66,13 ± 2,19	0,00	95,61 ± 1,06	0,94 ± 0,17	0,81 d
E11	106,03 ± 0,48	0,00	131,71 ± 0,7	11,05 ± 0,89	0,74 c
E12	84,55 ± 0,39	0,00	106,09 ± 0,46	0,46 ± 0,02	0,61 b

Los valores de las respuestas, que se muestran en una misma columna con diferentes letras, varían significativamente una de otra (p-value<0,05).

La referencia [11] reporta niveles de azúcares reductores de 18,31 g/l al final de la fermentación (220 g/l de azúcares reductores al inicio). En el presente estudio se pudieron alcanzar niveles más bajos (1,07 g/l), para muestras que iniciaron con la misma proporción de estos azúcares, para un tiempo de fermentación aproximadamente igual.

En cuanto al ajuste del modelo, se pudo determinar los coeficientes de regresión tomando como variable de respuesta la velocidad de consumo de azúcares, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Coeficientes y significancia estadística del modelo de regresión tomando como variable de respuesta el consumo de azúcares.

Coefficientes	p-value
b0	0,6428
b1	0,0046
b2	0,0301
b3	0,0823
b4	-0,0199

b5	-0,0467	0,000287
b6	-0,0069	0,506
b7	0,0220	0,04465

Los coeficientes con p-value < 0,05, influyen significativamente sobre la variable de respuesta.

De esta forma se pudo establecer que los °Brix al inicio de la fermentación, la temperatura de fermentación, la higienización y la fuente de nitrógeno, tiene influencia significativa sobre la velocidad de consumo de azúcares. En cuanto método de higienización con metabisulfito,[6] establece que el dióxido sulfuroso estimula el metabolismo de la levadura, pero no se recomienda la utilización de esta metodología ya que las hidromieles obtenidas presentan defectos sensoriales (datos no mostrados), así que se establece el proceso de pasterización como método de higienización.

#### Producción de etanol

La Tabla 4, muestra el contenido final de etanol de cada uno de los ensayos realizados. De acuerdo a esta, se puede observar que E9 presenta el mayor porcentaje de este producto. [12] establece que el contenido de alcohol en una muestra de hidromiel varía del 9 al 18 % v/v. Además se pudo identificar que el contenido de etanol está influenciado significativamente por los °Brix iniciales, el tipo de inóculo empleado y la fuente de nitrógeno, de acuerdo al modelo de regresión ajustado, cuyos coeficientes de pueden observar en la Tabla 5.

#### Producción de Glicerina

La producción de glicerol es un parámetro clave, ya que le imparte al hidromiel una mayor sensación de cuerpo y llenado en boca, la concentración promedio de glicerol en hidromieles puede variar entre 1,4 y 10 g/l [13].

Tabla 4. Contenido de Etanol al final de proceso de fermentación de cada uno de los ensayos realizados.

Ensayos	Etanol %Vol.
	Final
E1	11,49 ± 0,15 <sup>a,b,c,d</sup>
E2	10,56 ± 0,03 <sup>a,b,d</sup>
E3	11,96 ± 0,06 <sup>a,c,d</sup>
E4	13,15 ± 0,29 <sup>e</sup>
E5	13,08 ± 0,44 <sup>e</sup>
E6	11,74 ± 0,11 <sup>a,c,d</sup>
E7	10,51 ± 0,51 <sup>a,b</sup>
E8	11,29 ± 0,09 <sup>a,b,c,d</sup>
E9	14,21 ± 0,11 <sup>f</sup>
E10	11,15 ± 0,07 <sup>a,b,c,d</sup>
E11	13,02 ± 0,43 <sup>e</sup>
E12	11,57 ± 0,04 <sup>a,b,c,d</sup>

Los valores de las respuestas, que se muestran en una misma columna con diferentes letras, varían significativamente una de otra (p-value<0,05).

En la Tabla 6, podemos observar que E11, presenta la mayor concentración (9,59 g/l) de glicerina al final de la fermentación. Este valor que se encuentra dentro rango establecido para bebidas alcohólicas de este tipo.

Tabla 5. Coeficientes y significancia estadística del modelo de regresión tomando como variable de respuesta el contenido final de etanol.

	Coeficientes	p-value
b0	11,98	1,07927E-23
b1	-0,115	0,357
b2	0,841	3,53258E-06

b3	-0,123	0,326
b4	-0,331	0,01515
b5	0,07517	0,546
b6	-0,220	0,08897
b7	0,318	0,01885

Los coeficientes con p-value < 0,05, influyen significativamente sobre la variable de respuesta.

Se pudo establecer mediante el modelo de regresión lineal (Tabla 7), que todos los factores influyen en la producción de glicerol, excepto la temperatura de fermentación, esto resultados difieren para este factor, sobre los obtenidos por [13], ya que establecen que la temperatura influye significativamente en la estimulación de la producción de glicerol, también afirman que la fuente de nitrógeno influye significativamente sobre esta variable de respuesta, esto también ocurre en la presenta investigación.[14] establece que la producción de glicerol se ve influenciada cuando el contenido de azúcares es alto.

#### Producción de Ácidos orgánicos (succínico, láctico y acético)

Como se puede observar en la Tabla 8, el ensayo 11 (E11), presenta el mayor contenido de ácido succínico (1,31 g/l).La acidificación del mosto de miel es necesaria para un correcto progreso de la fermentación. En los primeros días la acidez es lo suficiente para asegurar un pH óptimo que estimule el crecimiento de la levadura [12]. [12] reporta la producción de ácido succínico en su trabajo de investigación, alcanzando niveles de 0,1 a 0,42 g/l.

Tabla 6. Contenido de glicerol al final de proceso de fermentación de cada uno de los ensayos realizados.

Ensayos	Glicerol/g/l
	Final
E1	5,2 ± 0,05 <sup>a</sup>
E2	4,85 ± 0,09 <sup>a</sup>
E3	8,84 ± 0,01 <sup>g,h,i</sup>
E4	8,93 ± 0,12 <sup>h,i</sup>
E5	6,57 ± 0,19 <sup>b,c</sup>
E6	7,46 ± 0 d, <sup>e</sup>
E7	6,85 ± 0,11 <sup>b,c,d</sup>
E8	5,26 ± 0,15 <sup>a</sup>
E9	8,37 ± 0,17 <sup>f,g,h</sup>
E10	7,19 ± 0,03 <sup>c,d,e</sup>
E11	9,59 ± 0,24 <sup>j</sup>
E12	8,09 ± 0,15 <sup>f,g</sup>

Los valores de las respuestas, que se muestran en una misma columna con diferentes letras, varían significativamente una de otra (p-value<0,05).

De acuerdo al modelo de regresión lineal, la producción de ácido succínico está influenciada por los °Brix iniciales en el mosto, la temperatura de fermentación, el tipo de inóculo, el tipo de levadura y la fuente de nitrógeno (Tabla 9).

Tabla 7. Coeficientes y significancia estadística del modelo de regresión tomando como variable de respuesta el contenido final de glicerol.

	coeficientes	P-value
b0	7,27	6,58191E-20
b1	-0,566	0,00041
b2	0,650	0,000107743
b3	0,177	0,184
b4	-0,384	0,00829
b5	-0,47800	0,002
b6	-0,490	0,00143
b7	0,798	0,00001

Los coeficientes con  $p\text{-value} < 0,05$ , influyen significativamente sobre la variable de respuesta.

En el presente trabajo también se pudo establecer que durante el proceso de fermentación, la levadura produce ácido láctico, resultados que concuerda con lo reportado por [12]. Contrariamente a lo reportado por estos autores (1 g/l), en el presente trabajo se producen niveles de ácido láctico menores (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de ácidos al final de proceso de fermentación de cada uno de los ensayos realizados.

Ensayos	Succínico/g/l	Láctico/g/l	Acético/g/l
	Final	Final	Final
E1	0,51 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a,c</sup>	0,48 ± 0,02 <sup>a,b,c,d</sup>
E2	0,13 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,32 ± 0,03 <sup>a,b,c,d</sup>
E3	0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,7 ± 0,13 <sup>d,e,f</sup>
E4	1,04 ± 0,06 <sup>d,e,f</sup>	0,06 ± 0,002 <sup>b,c</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a,b,c,d</sup>
E5	0,68 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,46 ± 0,07 <sup>a,b,c,d</sup>
E6	1,12 ± 0,001 <sup>d,e,f</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	0,2 ± 0,05 <sup>b,c</sup>
E7	1,02 ± 0,01 <sup>d,e</sup>	0,2 ± 0,005 <sup>d</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>a,b,c,d</sup>
E8	0,21 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,77 ± 0,04 <sup>e,f</sup>
E9	1,06 ± 0,03 <sup>d,e,f</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
E10	1,16 ± 0,01 <sup>d,f</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>	0,49 ± 0,004 <sup>a,b,c,d</sup>
E11	1,31 ± 0,03 <sup>g</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>e,f</sup>
E12	0,46 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,51 ± 0,002 <sup>a,b,c,d,e</sup>

Los valores de las respuestas, que se muestran en una misma columna con diferentes letras, varían significativamente una de otra ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

De esta manera, observando los coeficientes de ajuste del modelo de regresión (Tabla 9), se pudo establecer que la producción de ácido láctico en hidromieles está influenciada por el tipo de miel, la temperatura de fermentación, y la fuente de nitrógeno empleada.

La producción de ácido acético, es un parámetro importante en la producción de hidromieles, ya que es un indicador de calidad. Los valores normales en las regulaciones varían entre 0,4 a 0,5 g/l de ácido acético [13]. Como se puede observar, en el presente trabajo se obtuvieron valores por encima, para algunos ensayos (E3, E8 y E11) (Tabla 8). [12] reporta en su trabajo hidromieles con valores de ácido acético de 1,3 g/l, además establece que la cantidad de acetato en hidromieles depende principalmente de la concentración de carbohidratos, la fuente de nitrógeno, como también del pH del medio. Para las hidromieles elaboradas se pudo establecer que la producción de ácido acético depende de principalmente del tipo de miel empleado, del contenido de sólidos solubles (concentración de azúcares), de la temperatura de fermentación, del tipo de inoculación, de la levadura, y de la fuente de nitrógeno (Tabla 9). [13] reporta que la producción de ácido acético, se ve influenciada por la temperatura de la fermentación y la concentración de la fuente de nitrógeno.

Tabla 9. Coeficientes y significancia estadística del modelo de regresión tomando como variable de respuesta el contenido final de cada uno de los ácidos determinados.

Coef.	Succínico		Láctico		Acético	
	Coeficiente s	p-value	Coeficientes	p-value	Coeficientes	p-value
b0	0,741	6,20345E-17	0,206	3,4303E-15	0,490	5,56746E-16
b1	0,03507	0,09878	-0,08688	1,85167E-09	-0,09175	1,73066E-05
b2	0,05521	0,01396	0,01053	0,162	0,04854	0,00566
b3	-0,06841	0,00352	0,01904	0,01751	0,107	2,78374E-06
b4	-0,06343	0,00594	0,00242	0,741	-0,05120	0,00392
b5	-0,01690	0,411	0,00396	0,589	-0,000665	0,966
b6	0,07524	0,00171	-0,01053	0,162	0,07934	8,42906E-05
b7	0,378	2,28766E-12	-0,04687	7,04703E-06	-0,04987	0,00471

Los coeficientes con  $p\text{-value} < 0,05$ , influyen significativamente sobre la variable de respuesta.

Para el establecimiento de las condiciones de fermentación se tomó como base los coeficientes determinados del ajuste del modelo Plackett-Burman, que influyen significativamente ( $p\text{-value} < 0,05$ ) las variables de respuestas estudiadas. De esta manera, las condiciones que maximizan las variables de respuesta como la velocidad de consumo de azúcares, la producción de etanol, la producción de glicerol, o la producción de ácido succínico se obtienen a través de los coeficientes que afectan significativamente a éstas teniendo en cuenta que si estos tienen un valor positivo, se escoge el nivel mayor evaluado para dicha variable (+1) y si el coeficiente presenta un valor negativo se escoge el nivel inferior (-1). Si se desea minimizar la producción de determinado compuesto, como en el caso del ácido acético, y si el coeficiente del factor significativo es positivo, se toma el nivel menor (-1), y si el coeficiente es negativo, se toma el nivel mayor (+1). Entonces para el caso de la velocidad de consumo de azúcares donde queremos maximizar este valor, el coeficiente de regresión hallado para la temperatura de fermentación fue de 0,0832 con un  $p\text{-value} < 0,05$ . Así, que si deseamos que esta variable de respuesta sea la mayor, debemos seleccionar el mayor nivel de este factor (30 °C). En el caso contrario para la producción de etanol, el coeficiente de regresión para el tipo de inóculo fue de -0,331 con un  $p\text{-value} < 0,05$ , entonces si deseamos maximizar la producción de éste debemos escoger el menor nivel (Activación) para que la variable de respuesta no disminuya tanto (por el signo negativo del coeficiente). En cuanto a la producción de ácido acético donde se desea minimizar la producción de este compuesto, el coeficiente de regresión para el tipo de miel fue de -0,09175 con un  $p\text{-value} < 0,05$ . Entonces si deseamos que este valor sea lo más pequeño y debido a que el coeficiente es negativo se debe escoger el nivel mayor (Miel de Boyacá). Lo contrario ocurre con el coeficiente del tipo de levadura (0,07934,  $p\text{-value} < 0,05$ ), así que se debe seleccionar el menor nivel (UVAFERM) para obtener una menor cantidad de este compuesto.

#### IV. CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo establecer que parámetros de fermentación como los evaluados aquí, influyen significativamente sobre las variables más representativas en la producción de hidromiel. También que esta metodología puede ser empleada para definir factores importantes que pueden ser optimizados en estudios posteriores. Además, el presente trabajo permitió establecer las condiciones de fermentación para un hidromiel, utilizando mieles de abejas colombianas. De esta manera decimos que para la elaboración de bebidas alcohólicas a base de este producto, bajo los límites establecidos, las mejores condiciones de trabajo son: utilizar miel proveniente de cualquier de las dos procedencias, aunque la del Huila estimula la producción de ácido acético. 24 °Brix como contenido de azúcar inicial, 30 °C como temperatura de fermentación, activando la levadura, utilizando la pasterización, aunque se sabe que el metabisulfito estimula el metabolismo de la levadura, pero se ha comprobado que

también confiere un mal sabor al producto final. Se debe seleccionar la levadura comercial UVAFERM, y se aconseja utilizar polen para la elaboración de hidromiel.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional sede Bogotá, por la financiación del presente trabajo y por el soporte prestado en todos los aspectos.

#### REFERENCIAS

- [1] E. Šturd, P. Gemeiner, and M. Navratil, "Batch and continuous mead production with pectate immobilised , ethanol-tolerant yeast," *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, pp. 977–982, 2001.
- [2] a. Roldán, G. C. J. van Muiswinkel, C. Lasanta, V. Palacios, and I. Caro, "Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics," *Food Chem.*, vol. 126, pp. 574–582, May 2011.
- [3] A. Mendes-Ferreira, F. Cosme, C. Barbosa, V. Falco, A. Inês, and A. Mendes-Faia, "Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 144, pp. 193–8, Nov. 2010.
- [4] E. M. Morales, V. E. Alcarde, and D. de Franceschi de ANGELIS, "Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (lalvin k1-1116)," *African J. Biotechnol.*, vol. 12, no. 2, pp. 199–204, Jan. 2013.
- [5] I. Sarudi and J. Kelemen, "Determination of sulphur and total sulphur dioxide in wines by an ICP-AES method.," *Talanta*, vol. 45, pp. 1281–4, Apr. 1998.
- [6] T. Garde-Cerdán, a. R. Marsellés-Fontanet, M. Arias-Gil, O. Martín-Belloso, and C. Ancín-Azpilicueta, "Influence of SO<sub>2</sub> on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields," *Food Chem.*, vol. 103, pp. 771–777, Jan. 2007.
- [7] A. P. Pereira, T. Dias, J. Andrade, E. Ramalhosa, and L. M. Estevinho, "Mead production: selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, pp. 2057–63, Aug. 2009.
- [8] A. P. Pereira, A. Mendes-Ferreira, J. M. Oliveira, L. M. Estevinho, and A. Mendes-Faia, "High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production," *Food Microbiol.*, vol. In press, pp. 1–10, Sep. 2012.
- [9] A. Tanimura, T. Nakamura, I. Watanabe, J. Ogawa, and J. Shima, "Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature.," *Springerplus*, vol. 1, no. 1, p. 27, Jan. 2012.
- [10] E. F. López and E. F. Gómez, "Simultaneous Determination of the Major Organic Acids , Sugars , Glycerol , and Ethanol by HPLC in Grape Musts and White Wines," *Journa Chromatogr. Sci.*, vol. 34, pp. 254–257, 1996.
- [11] C. Chen, Y. Wu, D. Lo, and M. Wu, "Physicochemical property changes during the fermentation of longan ( *Dimocarpus longan* ) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations," no. 1, pp. 303–308, 2013.
- [12] P. Sroka and T. Tuszyński, "Changes in organic acid contents during mead wort fermentation," *Food Chem.*, vol. 104, pp. 1250–1257, Jan. 2007.
- [13] T. Gomes, C. Barradas, T. Dias, J. Verdial, J. Sá, E. Ramalhosa, and L. M. Estevinho, "Optimization of mead production using Response Surface Methodology," *FOOD Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 680–686, 2013.
- [14] D. Balli, V. Flari, E. Sakellaraki, V. Schoina, M. Iconomopoulou, a. Bekatorou, and M. Kanellaki, "Effect of yeast cell immobilization and temperature on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making," *Process Biochem.*, vol. 39, no. 4, pp. 499–506, Dec. 2003.