



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel

Andrés Mauricio Martínez Hoyos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2016

Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel

Andrés Mauricio Martínez Hoyos

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):
PhD., Marta Cecilia Quicazán

Línea de Investigación:
Procesamiento

Grupo de Investigación:
Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2016

Dedicatoria

A mis padres por darme la oportunidad de existir.

A mi hermana por ser mi gran amiga y apoyo.

A Diana por su amor incondicional.

Agradecimientos

A la PhD. Marta Cecilia Quicazan por guiarme en el desarrollo de este proyecto y contribuir en mi formación profesional.

Al Ingeniero Amaury Blanco y al Ingeniero Giordan Vivas por su acompañamiento en el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA por su paciencia y colaboración en el laboratorio.

Gracias a Colciencias por su apoyo en el proyecto desarrollado.

A la División de Investigación de la sede Bogotá DIB, y su programa de “Apoyo para Tesis de Investigación de Posgrados” por la financiación de la Tesis.

Al Jardín Botánico de Bogotá por su apoyo económico mediante el programa de Estímulos a la investigación *Thomas Van der Hammen*.

A mis amigos: Yolanda, Jorge, Marvin, Ibeth, Ruth Mary, José, William, Zain, Andrea y Carlos.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar cómo la disposición de las células de levadura (libres o inmovilizadas) en el fermentador, el tipo de miel (floral o mielato) y la temperatura manejada (25°C o 30 °C) influyen sobre las principales características fisicoquímicas y sensoriales en la producción de hidromiel la cual es una bebida alcohólica tipo vino producida a partir de miel diluida en agua. La concentración de azúcares, etanol, acidez total, volátil y glicerol se midieron durante el proceso. Se realizó análisis sensorial con un panel entrenado de 8 panelistas. El análisis estadístico mostró que existe una mayor producción de etanol en la fermentación con miel floral en relación con miel de mielato (12.14% p/v vs 10.9% p/v respectivamente), al igual que con el uso de levadura inmovilizada en Alginato de sodio. El rendimiento del proceso no presentó diferencias significativas respecto al tipo de miel pero si respecto al tipo de célula siendo mayor cuando se usaron células inmovilizadas en alginato con un valor promedio de 0.48 g de etanol/ gramo de glucosa. La productividad por su parte si depende de los tres factores estudiados y de las interacciones entre ellos. El proceso de inmovilización en alginato permitió la reutilización de las células de levadura durante 4 fermentaciones continuas sin verse afectado su rendimiento. Los resultados del análisis sensorial coinciden con los resultados fisicoquímicos encontrados, obteniéndose en general un producto aceptable en todos los tratamientos.

Palabras clave: Fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae*, miel, hidromiel.

Abstract

The aim of this study was to evaluate variables as the disposition of yeast cells (free or immobilized) in the biofermenter, the kind of honey (floral or honeydew) and temperature handled (25 ° C or 30 ° C) and determine the influence of these in physicochemical and sensory characteristics in the production of mead. A sensory analysis with one panel of 8 panelists trained was conducted. The concentration of sugars, ethanol, and total volatile acidity was measured during the process. Statistical analysis showed more ethanol production in the fermentation with floral honey in relation to honeydew honey (12.14% w / v vs 10.9% w / v respectively). These differences were also found according to the cellular condition; the alcohol production was greater when the fermentation was carried out with immobilized cells. There were interactions between the kind of honey and the disposition of the yeast (free or immobilized) as well as between the type of honey and the temperature handled. Process performance did not show significant differences in the kind of honey, but it was different respect to the substrate of immobilization, when the cell was immobilized in alginate, process performance was major, with an average value of 0.48 g ethanol / g glucose. Productivity was dependent of the three factors studied and the interactions between them. The process of immobilization in alginate allowed reusing yeast cells into four continuous fermentations without affecting performance. The results of sensory analysis matched with the physicochemical parameters studied.

Keywords: alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, honey, mead.

Contenido

	Pag.
1. Marco teórico.....	4
1.1 Fermentación alcohólica	5
1.2 El proceso fermentativo en la fabricación de vino	6
1.2.1 Composición del vino	7
1.2.2 Microorganismos utilizados en la fermentación de vino	8
1.2.3 Adecuación del mosto para el proceso fermentativo.....	10
1.2.4 Etapas posteriores al proceso fermentativo del vino.....	11
1.3 Inmovilización celular.....	12
1.3.1 Métodos de inmovilización.....	13
1.3.2 Matrices porosas usadas en procesos de inmovilización.....	16
1.3.3 La producción de alcohol por células inmovilizadas.....	19
1.4.1 Composición química de la miel	21
1.4.2 Potencial antimicrobiano de la miel	22
1.5 Hidromiel.....	23
1.5.1 Condiciones de proceso en la elaboración de hidromiel	25
1.5.2 Azúcares fermentables para la elaboración de hidromiel.....	29
1.5.3 Fuente de nitrógeno	29
1.5.4 Higienización del mosto.....	30
1.5.5 Inoculación de la levadura	31
1.5.6 Microorganismos utilizados en la producción de hidromiel	31
1.5.7 Características fisicoquímicas del producto final	33
1.5.8 Características sensoriales.....	33
1.5.9 Uso de células inmovilizadas en la producción de hidromiel.....	35
2. Metodología	36
2.1 Materias primas	36
2.1.1 Miel y Mielato	36
2.1.2 Levadura	37

2.1.3 Carragenina	37
2.1.4 Alginato.....	37
2.2 Evaluación de soportes para la inmovilización de levadura.	38
2.2.1 Inmovilización de levadura en alginato de sodio	38
2.2.2 Inmovilización de levadura en carragenina.....	38
2.2.3 Caracterización de las esferas	39
2.3 Comparación del proceso fermentativo de miel usando células libres e inmovilizadas.....	40
2.3.1 Diseño experimental	40
2.3.2 Métodos analíticos y procedimientos para seguimiento de la fermentación.....	40
2.3.3 Procedimientos para la elaboración de hidromiel	42
2.3.4 Evaluación sensorial	43
2.3.5 Análisis estadístico.....	43
2.4 Reutilización de células en nuevas fermentaciones	44
3. Resultados y discusión	45
3.1 Caracterización de materia prima	45
3.1.1 Análisis fisicoquímico	45
3.1.2 Análisis microbiológicos	46
3.2 Evaluación de soportes para inmovilización	46
3.2.1 Selección de condiciones de inmovilización en esferas de carragenina	46
3.2.2 Caracterización de esferas de alginato y carragenina	48
3.3 Seguimiento del proceso fermentativo	49
3.3.1 Comportamiento de los sólidos solubles	49
3.3.2 Evaluación de acidez total.....	53
3.3.3 Seguimiento de pH.....	56
3.3.4 Determinación de acidez volátil.....	59
3.3.5 Evaluación de la concentración de etanol	60
3.3.6 Rendimiento y productividad	62
3.4 Análisis de componentes principales	65
3.5 Análisis sensorial.....	66
3.6 Reutilización de células	73
4. Conclusiones y recomendaciones	77
4.1 Conclusiones.....	77
4.2 Recomendaciones.....	79
5. Anexos.....	80
6. Bibliografía.....	127

Lista de figuras

	Pag.
Figura 3-1: Disminución de sólidos solubles en la fermentación de miel usando células libres e inmovilizadas en alginato y carragenina.....	51
Figura 3-2: Contenido de sólidos solubles durante la fermentación de mielato usando células libres e inmovilizadas en alginato y carragenina.....	52
Figura 3-3: Resultados de acidez total (g/L de ácido tartárico) para fermentación con miel usando células libres e inmovilizadas.....	54
Figura 3-4: Resultados de acidez total (g/L de ácido tartárico) para fermentación con mielato usando células libres e inmovilizadas	54
Figura 3-5: Resultados de pH para fermentación con miel usando células libres e inmovilizadas.....	57
Figura 3-6: Resultados de pH para mielato.	58
Figura 3-7: Seguimiento a la producción de etanol en fermentación con miel	61
Figura 3-8: Seguimiento a la producción de etanol en fermentación con mielato.....	62
Figura 3-9: Análisis de componentes principales para las variables estudiadas en la elaboración de hidromiel	66
Figura 3-10: Análisis sensorial del hidromiel obtenido a partir de miel con células libres e inmovilizadas.....	68
Figura 3-11: Análisis sensorial del hidromiel obtenido a partir de mielato con células libres e inmovilizadas.....	68
Figura 3-12: Grafico de cajas y bigotes para variable limpidez	69
Figura 3-13: Grafico de cajas y bigotes para variable matiz	70
Figura 3-14: Evaluación sensorial de parámetros visuales en fermentación con Miel...	71
Figura 3-15: Evaluación sensorial de parámetros visuales en fermentación con mielato	71
Figura 3-16: Evaluación sensorial olfativa de la fermentación alcohólica de miel	72
Figura 3-17: Evaluación sensorial olfativa de la fermentación alcohólica de mielato	73

Lista de tablas

	pag.
Tabla 1-1: Requisitos específicos de los vinos de fruta según norma técnica colombiana NTC 708.	8
Tabla 1-2: Efecto del proceso de inmovilización en distintos microorganismos	12
Tabla 1-3: Condiciones del mosto, tipo de microorganismo utilizado y tiempo de fermentación reportados en literatura para la elaboración de hidromiel.	26
Tabla 1-4: Características fisicoquímicas de hidromiel en los parámetros de grado alcohólico, pH, acidez total y volátil reportados en literatura.	33
Tabla 3-1: Análisis fisicoquímico para miel floral y miel de mielato.....	45
Tabla 3-2: Análisis microbiológico de miel floral y miel mielato.	46
Tabla 3-3: Resultados de TPA en esferas de carragenina al 3% p/v con diferentes soluciones de cloruro de potasio (8, 12 y 16 %).	47
Tabla 3-4: Efecto del medio de fermentación en la estabilidad de las esferas.....	48
Tabla 3-5: Caracterización de las esferas de alginato y carragenina usadas para la inmovilización.....	48
Tabla 3-6: Conteo de células de levadura inmovilizadas en diferentes matrices.	49
Tabla 3-7: Determinación de acidez volátil (g/L de ácido acético) para hidromiel a partir de miel.	59
Tabla 3-8: Determinación de acidez volátil (g/L de ácido acético) para hidromiel a partir de mielato.	59
Tabla 3-9: Evaluación de rendimiento y productividad en fermentación con miel usando células libres y células inmovilizadas.	64
Tabla 3-10: Evaluación de rendimiento y productividad en fermentación con mielato usando células libres y células inmovilizadas.....	64
Tabla 3-11: Azúcares consumidos durante el proceso de fermentación.....	65
Tabla 3-12: Análisis de Componentes Principales	66

Tabla 3-13: Análisis sensorial de los hidromieles elaborados (valores expresados en valor de mediana).	67
Tabla 3-14: Análisis sensorial de parámetros visuales	69
Tabla 3-15: Análisis sensorial de parámetros olfativos	72
Tabla 3-16: Evaluación fisicoquímica de las fermentaciones sucesivas con células inmovilizadas en alginato.	75

Tabla de Anexos

	pág.
Anexo A: Formato para evaluación sensorial aplicada a hidromieles.	81
Anexo B: Análisis estadísticos para disminución de grados Brix	84
Anexo C: Análisis estadísticos para Acidez total	89
Anexo D: Análisis estadísticos para pH.....	94
Anexo E: Análisis estadístico para acidez volátil	99
Anexo F: Análisis estadísticos para concentración de etanol	102
Anexo G: Análisis estadístico para la variable tiempo	106
Anexo H: Estadística para la variable rendimiento	111
Anexo I: Análisis estadístico para variable productividad	114
Anexo J: Análisis estadísticos para variable glicerol.....	119
Anexo K: Registro fotográfico.....	121

Introducción

Colombia es un país mega diverso, con vocación agrícola y con un alto potencial a nivel agroindustrial. Las principales actividades agropecuarias del país están organizadas en cadenas productivas que permiten un mayor control y apoyo para las familias campesinas; dentro de estas, la cadena apícola es una de las más recientemente constituidas, caracterizada por la presencia de un gran número de apicultores que generan diferentes productos con interés para el mercado nacional; sin embargo, es una actividad con baja participación frente a la producción mundial y un limitado nivel de transformación agroindustrial (Laverde *et al.* 2010). Estos aspectos han dado lugar a una baja competitividad del sector y consecuentemente han dificultado su crecimiento.

La importancia de la actividad apícola y su desarrollo no solo radica en el aspecto económico sino en un conjunto de beneficios ambientales, ya que las abejas son responsables de un alto porcentaje en el proceso de polinización de los frutos, lo cual representa un beneficio directo para la agricultura y la seguridad alimentaria del planeta.

Existen diferentes alternativas para diversificar el mercado de los productos apícolas en el país dando mayor ganancia al apicultor y contribuyendo al desarrollo de la productividad y competitividad de la cadena; una de estas alternativas es la fabricación de un producto fermentado a partir de miel, conocido tradicionalmente como hidromiel el cual tiene una buena aceptación en los países consumidores. En Colombia esta bebida se realiza principalmente de manera artesanal por los apicultores, aplicando en muchos casos un proceso de fermentación espontánea por parte de levaduras presentes en la miel y sin un protocolo de elaboración lo cual puede causar problemas de contaminación y baja uniformidad en el producto final. El Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia ha sido pionero en la elaboración de hidromiel bajo condiciones controladas de concentración de miel, tipo de levadura, fuente de nitrógeno y temperaturas de proceso, contando con gran experiencia en este campo de investigación.

Tradicionalmente la levadura del género *Saccharomyces* ha sido utilizada en forma libre en los procesos de fermentación alcohólica; no obstante en los últimos años ha existido un interés en el uso de células inmovilizadas. La inmovilización celular es una técnica que permite la fijación de la levadura sobre un soporte sólido, reteniendo de esta manera la levadura para facilitar su manejo y creando un microambiente al interior del soporte con el objetivo de mejorar parámetros de rendimiento o productividad y/o modificar la producción de ciertos metabolitos de interés.

En la industria alimentaria las células inmovilizadas, han sido utilizadas en la elaboración de vino, sidra, cerveza, destilados, alcohol de boca y la producción de nuevas bebidas con diferentes soportes y técnicas de inmovilización que le confieren al producto final cambios en sus características organolépticas (Lee *et al.* 2012; Kourkoutas *et al.* 2004). usándose también con microorganismos prebióticos y procesos de producción de antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas y alcoholes (Park & Chang 2000).

El uso de células inmovilizadas en la fermentación alcohólica ha sido uno de los sistemas más estudiados en investigación (Ghorbani *et al.*, 2011; Ramakrishna & Prakasham, 2009; Watanabe *et al.*, 2012). El efecto causado por el proceso de inmovilización en la levadura está relacionado con modificaciones en sus procesos fisiológicos y metabólicos. Los resultados del uso de células inmovilizadas en procesos de fermentación alcohólica son diversos y están muy relacionados con el medio y las condiciones de fermentación.

Respecto a la elaboración de hidromiel las principales investigaciones se han realizado usando células libres, mientras que los estudios con células inmovilizadas son escasos desconociéndose muchos de los efectos que esta metodología pueda tener en el producto final.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar diferencias en el proceso fermentativo de una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel, utilizando células de levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) libres e inmovilizadas.

Objetivos específicos

Evaluar diferentes soportes de inmovilización para células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Comparar el comportamiento del proceso fermentativo bajo diferentes condiciones utilizando células libres e inmovilizadas.

Evaluar la reutilización de las células inmovilizadas en el proceso fermentativo de acuerdo con la eficiencia del proceso y la calidad del producto.

1. Marco teórico

La apicultura es la actividad dedicada a la cría de las abejas, las cuales son consideradas agentes polinizadores por excelencia, ya que permiten la reproducción de gran número de especies vegetales y el aumento del volumen de producción y calidad de algunos frutos (Laverde *et al.* 2010). Es considerada una actividad económica que representa gran importancia principalmente en países europeos, por lo que se han buscado diversos métodos de transformación de la materia prima obtenida de las abejas, que les permitan diversificar su mercado (Gomes *et al.* 2013). Entre algunos de los productos derivados de la apicultura se encuentran: la miel, el polen, los propóleos, la jalea real, la cera y la apitoxina (Gomes *et al.* 2013; Laverde *et al.* 2010).

En el año 2012, las cifras de comercialización mostraron una exportación mundial de 526.193 toneladas y una importación de 518.414 toneladas, siendo Estados Unidos, Alemania, Reino Unido y Japón los principales compradores (TRADEMAP 2014). Según datos oficiales de la FAO, Colombia tuvo una producción estimada para este mismo año de cerca de 2000 toneladas frente a más de 450.000 reportadas por China; país considerado el mayor productor de miel (FAOSTAT 2012).

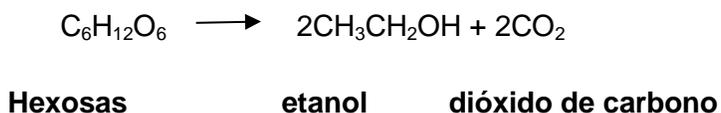
A pesar que la miel es conocida como un edulcorante natural que presenta excelentes características físicas, químicas, microbiológicas y bioactivas de importancia en la industria alimentaria (Ramalhosa *et al.* 2011) su comercialización en muchos mercados mundiales tiende a ser difícil, razón por la cual se vende a precios bajos ocasionando pérdidas para el apicultor (Gomes *et al.* 2013). En el mercado nacional, la miel tiene precios altos respecto a otros países; sin embargo las mieles cristalizadas, vendidas en Europa como mieles de calidad, en Colombia no son apreciadas, pues se asocian a procesos de adulteración con panela o azúcar, desconociéndose el proceso natural de cristalización y su potencial como resultado del alto contenido de azúcares.

Aprovechar la alta concentración de azúcares fermentables para la obtención de una bebida alcohólica elaborada tradicionalmente de forma artesanal y conocida como hidromiel es una alternativa que puede ser viable en Colombia; sin embargo su proceso de elaboración no se encuentra bien documentado por cuanto se requiere tener en cuenta el proceso de elaboración de vino de mesa para el desarrollo del producto.

1.1 Fermentación alcohólica

Los procesos fermentativos han sido parte fundamental en el desarrollo de las comunidades, inicialmente estos se realizaban de forma espontánea aprovechando las condiciones del medio y los microorganismos que se encontraban normalmente en los alimentos o el ambiente; con el tiempo el hombre aplicó la fermentación a la elaboración de una diversidad de productos que se utilizan cotidianamente. La elaboración de bebidas alcohólicas con la ayuda de este proceso es quizá una de las más aplicadas; productos como vino, cerveza, sidra, champaña, han sido obtenidos durante siglos conquistando los mercados mundiales.

La fermentación alcohólica es la transformación anaeróbica de azúcares, principalmente hexosas como la glucosa y la fructosa, en etanol y dióxido de carbono, así como la generación de un gran número de subproductos (Moreno Arribas & Polo 2005; Zamora 2009). Este proceso puede ser llevado a cabo por levaduras y también por bacterias como *Zymomonas mobilis* (Zamora 2009). La reacción simplificada se encuentra descrita en la ecuación 1-1:



Ecuación 1-1 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica implica diferentes procesos bioquímicos, químicos y fisicoquímicos que generan además del etanol, otros compuestos como: ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetilo, acetoína y 2,3 butanodiol. Particularmente en la producción del vino, la generación de algunos compuestos adicionales del jugo de uva, transformados por el metabolismo de la levadura, también le confieren gran parte de las propiedades organolépticas. Durante el proceso de elaboración factores como: las altas

concentraciones de azúcar, temperaturas extremas, la anaerobiosis extrema, la deficiencia de nutrientes, la presencia de sustancias antimicrobianas y de ácidos grasos de cadena media, así como el antagonismo entre microorganismos, pueden conducir a una fermentación alcohólica inapropiada y lenta (Zamora 2009).

1.2 El proceso fermentativo en la fabricación de vino

El proceso biológico de la vinificación es el resultado de una serie de transformaciones bioquímicas generadas por la acción de diferentes enzimas, que provienen de diversos microorganismos, especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura responsable de la principal parte del proceso de la fermentación alcohólica (Moreno Arribas & Polo 2005).

Esta levadura es uno de los microorganismos más utilizados en la fermentación debido a que resiste altas concentraciones de etanol, cercanas al 18% (Lin & Tanaka 2006). Dentro de la producción de bebidas alcohólicas, es frecuente el uso de cepas seleccionadas que otorgan ventajas como la de dominar sobre los hongos presentes naturalmente, los cuales podrían dar lugar al deterioro o a la formación de compuestos no deseables en el producto fermentado, además de mejorar la eficiencia del proceso y la predicción de las características del producto final (Sarma *et al.* 2013).

Al igual que muchos microorganismos, *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof (EM) (Lin & Tanaka 2006). Esta vía está involucrada en la conversión de triosa fosfatos a piruvato ((Pronk *et al.* 1996). La mayor parte de las cepas conocidas utilizan esta vía generando etanol y dióxido de carbono como productos predominantes de la fermentación, permitiendo la regeneración de NAD^+ consumido por la glicólisis (van Dijken & Scheffers 1986).

El éxito de la fermentación alcohólica depende del mantenimiento de la población con suficientes levaduras viables hasta que todo el azúcar fermentable ha sido completamente consumido (Moreno-Arribas & Polo 2010). Diferentes estudios sobre el metabolismo, la fisiología, la biología y la genética de esta especie de levadura han contribuido a mejorar el entendimiento de los diversos mecanismos involucrados en su adaptación al medio de fermentación y consecuentemente al proceso de fermentación alcohólica (Moreno Arribas & Polo 2005).

1.2.1 Composición del vino

La mayor parte de los componentes del vino proceden de su principal materia prima (la uva) la cual influye notoriamente en el producto final siendo los siguientes los de mayor importancia.

Agua: es el componente que se encuentra en mayor proporción y actúa como un disolvente de los demás. Proviene del agua de la vendimia. Un exceso de agua en el producto final dificulta su conservación (Mercado 1995).

Alcohol etílico: es el segundo de los componentes cuantitativos del vino, su valor se encuentra entre el 8 y el 18 % en vinificaciones normales. El alcohol etílico contribuye a solubilizar muchos de los componentes restantes del vino y evita el desarrollo de otro tipo de microorganismos (Mercado 1995).

Glicerol: es el tercer componente de los vinos. Tiene sabor ligeramente dulce y transmite al vino: cuerpo, consistencia y suavidad. Corresponde a un alcohol trivalente $C_3H_5(OH)_3$; en estado puro tiene aspecto líquido, espeso e incoloro, de sabor dulce y no venenoso. (Alzate 1988).

Alcoholes superiores: los alcoholes superiores están normalmente por debajo de su límite de detección, pero son los precursores de algunos ésteres, que tienen un gran impacto sensorial (Moreno-Arribas & Polo 2010). El amílico es el más abundante, aunque existen otros tales como el propílico y butílico (Mercado 1995).

Ácidos: en el vino existe mayor proporción de sustancias orgánicas de carácter ácido que en el mosto, estas sustancias se forman durante la fermentación alcohólica y en algunos procesos sucesivos, encontrándose en forma de ácidos libres o de sales ácidas; una correcta acidez influye en la estabilidad del color, el sabor y en la conservación del producto final (Mercado 1995). En el vino se distinguen los ácidos propios de la uva (tartárico, málico y cítrico) y los que se generan en el proceso de la fermentación (láctico, succínico y acético).

Acido succínico: es uno de los ácidos más importantes en el vino; está presente en concentraciones entre 0,6 y 1,2 g/l y contribuye significativamente a la acidez característica del producto (Moreno-Arribas & Polo 2010).

Ácido acético: es el principal compuesto responsable de la acidez volátil en el vino. Su presencia en altas concentraciones genera sabores y olores desagradables, por lo que el control de este parámetro es uno de los más importantes en enología. El ácido acético puede ser producido por la levadura, bacterias ácido lácticas y bacterias del ácido acético. En condiciones adecuadas de fermentación sólo *Saccharomyces cerevisiae* lo produce en pequeñas cantidades (0,1-0,3 g/l); sin embargo fermentaciones lentas pueden incrementar su valor (Moreno-Arribas & Polo 2010).

En Colombia la normatividad para vinos de frutas (NTC 708) exige que se cumplan los siguientes requisitos:

Tabla 1-1: Requisitos específicos de los vinos de fruta según norma técnica colombiana NTC 708.

Requisitos	Valores	
	Mínimo	Máximo
Contenido de alcohol o grados alcoholimétricos a 20°C	6	-
Acidez total expresada como ácido tartárico en g/dm ³	3.5	10
Acidez volátil expresada como ácido acético en g/ dm ³	-	1.2
Metanol en mg/dm ³ de alcohol anhidro	-	1000

(Norma técnica colombiana – NTC 708)

1.2.2 Microorganismos utilizados en la fermentación de vino

Los microorganismos más utilizados como cultivos iniciadores en la fermentación del vino son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica y las bacterias *Leuconostoc oenos* para la fermentación maloláctica (Cantarelli & Lanzarini 1989). Las levaduras son hongos unicelulares que han sido utilizados en los procesos de fermentación. *Saccharomyces cerevisiae* es una especie de levadura especializada en la metabolización de medios con un alto contenido de azúcar y pequeñas cantidades de compuestos nitrogenados. En el pasado, las levaduras nativas de la microbiota de la uva fermentaban los mostos, hoy en día la mayoría se inoculan con cepas de levadura seleccionadas y conservadas en forma seca (Suárez-Lepe & Morata 2012).

Es importante para una buena fermentación proporcionarle a la levadura las mejores condiciones de crecimiento, incluyendo temperatura, pH, nutrientes, niveles adecuados

de azúcar, una oportuna oxigenación y eliminación adecuada de CO₂. La inoculación con un número suficiente de colonias de levadura es muy importante. La fermentación debe comenzar de forma óptima a una temperatura cercana a 20 °C para que la levadura se aclimate. Las temperaturas demasiado bajas podrían limitar el crecimiento de la levadura y reducir la población al igual que una temperatura demasiado alta puede matarla (Jacobson 2006).

El número de células de levadura añadido a un sustrato se conoce como tasa de inoculación. La fermentación del mosto tiene una tasa de inoculación recomendada de 10⁶-10⁷ células/ml con una óptima población de levadura en la fermentación de 10⁸ células/ml; cuando la tasa de inoculación es baja, la fermentación puede terminar sin que todo el azúcar se haya fermentado (Jacobson 2006). El crecimiento de la levadura tiene un patrón específico que se divide en cuatro fases: **1.** Fase de latencia o período de tiempo en el que las células de levadura se acondicionan al pH, temperatura, y el contenido de azúcar del jugo o mosto; **2.** Fase de crecimiento donde las células crecen de forma exponencial; esta etapa puede durar varios días con una caída significativa en los niveles de azúcar,; durante esta fase el metabolismo se convierte en anaeróbico debido al aumento de la concentración de CO₂. **3.** La fase estacionaria comprende el período de tiempo en el que la levadura ha alcanzado su máximo crecimiento de la población y continúa la fermentación del azúcar restante con una baja tasa de reproducción; esta fase puede durar entre uno y dos días. La última fase (muerte celular), sucede debido al agotamiento de los nutrientes y al aumento de concentración de productos y de subproductos, que actúan como sustancias tóxicas para la levadura (Jacobson 2006) .

1.2.3 Adecuación del mosto para el proceso fermentativo

Los nutrientes adicionados al mosto en la fermentación alcohólica, se usan para evitar el retraso en el proceso ya que su deficiencia puede causar serios problemas durante la fermentación. Con frecuencia el nitrógeno, las vitaminas, los minerales, entre otros, son deficientes en los mostos destinados a la fermentación, por esta razón el uso de nutrientes comerciales es muy extendida en la industria vinícola (Cantarelli & Lanzarini 1989). Un activador estándar se compone de sales de amonio (fosfato diamónico) o sulfato de amonio que resulta un forma muy eficiente para aumentar el rendimiento y la productividad en la fermentación. La dosis de nitrógeno aplicada debe ser seleccionada cuidadosamente, teniendo en cuenta la concentración inicial de nitrógeno y el contenido alcohólico potencial del mosto. La adición de nitrógeno será más efectiva si se lleva a cabo dos o más veces y se combina con aireación; es recomendable que la primera dosis se añada cuando se inicia la fermentación, la segunda en el medio de la fase cuasi estacionaria y finalmente la tercera al final de esta etapa (Casellas 2005; Moreno-Arribas & Polo 2010).

- **pH y acidez**

La concentración de iones de hidrógeno es un importante factor microambiental que afecta el crecimiento celular y la producción de metabolitos; en la producción de etanol un pH cercano a 4 es reportado como óptimo (Buzás *et al.* 1989). El vino presenta un pH cercano a 3,6; el pH óptimo para las levaduras usadas en la vinificación se encuentra alrededor de 4,5, valor alrededor del cual también crecen otro tipo de microorganismos como las bacterias de putrefacción. Entre menor sea el pH del medio, menor será la tasa de crecimiento de las levaduras; adicionalmente las bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación pueden trabajar a un pH entre 3,3 y 3,6; La alta acidez del mosto (pH alrededor de 3,0 y 3,5) inhibe el crecimiento de muchos microorganismos, ya que solo crecen algunos microorganismos como las levaduras y las bacterias ácido lácticas (Cantarelli & Lanzarini 1989).

La mayoría de las bacterias tienen un pH óptimo cerca de 6,8 y puede crecer a valores de pH que van desde 4 a 8; solo un estrecho espectro de bacterias pueden multiplicarse

a pH menores a 4 o mayores que 8. Levaduras y mohos pueden crecer a pH menores que 2 (Cantarelli & Lanzarini 1989).

1.2.4 Etapas posteriores al proceso fermentativo del vino

Un mal manejo en las etapas posteriores a la fermentación, puede ocasionar una pérdida del producto final por contaminación y alteración de las características propias del vino. Los principales procesos que se deben tener en cuenta en esta etapa son:

Trasiego: en esta etapa se separa el materia insoluble que se deposita en el fondo del contenedor del mosto, este material está compuesto por levaduras muertas y desechos producidas por las células en el proceso de fermentación, que pueden contaminar el vino con sabores y olores desagradables (Mercado 1995).

Pasterización: es el proceso de someter el mosto a un calentamiento durante un cierto periodo de tiempo, seguido inmediatamente por un periodo de enfriamiento, con el fin de inactivar el crecimiento de las levaduras. Se debe tener en cuenta que temperaturas elevadas pueden alterar la composición del vino y que posterior a esta etapa se debe mantener las condiciones de higiene para evitar que el producto se contamine con microorganismos ambientales.

Clarificación y filtración: consiste en la adición al mosto ya fermentado, de una sustancia capaz de coagular y flocular las partículas en suspensión y algunos gérmenes patógenos arrastrándolos al fondo del recipiente, dando limpidez, brillo y transparencia (Mercado 1995). Los tratamientos de filtración van desde una filtración gruesa hasta tratamientos que permiten la esterilización por el tamaño de poro utilizado. En ocasiones los procesos de clarificación y filtración pueden ocasionar pérdidas de algunos aromas, atribuido a la unión de compuestos aromáticos a macromoléculas (Varnam & Sutherland 1994).

En los procesos de elaboración de hidromiel la bentonita y la gelatina en concentraciones comprendidas entre 0.3 y 0.4 g/l han sido utilizadas en el proceso de clarificación (Acosta 2012; Lee *et al.* 2012; Roldán *et al.* 2011).

1.3 Inmovilización celular

El proceso de inmovilización es la técnica utilizada para la fijación física o química de enzimas, células, organelos o proteínas sobre un soporte sólido, o retenido por una membrana, de modo que se aumenta su estabilidad y se haga posible su uso continuo. La inmovilización tiene una amplia gama de aplicaciones en la industria biotecnológica, farmacéutica, ambiental y alimentaria presentando algunas ventajas sobre las células libres (Barik 2014).

En la industria alimentaria las células inmovilizadas, han sido utilizadas en la elaboración de vino, sidra, cerveza, destilados, alcohol de boca y la producción de nuevas bebidas con diferentes soportes y técnicas de inmovilización que le confieren al producto final cambios en sus características organolépticas (Lee *et al.* 2012; Kourkoutas *et al.* 2004). La inmovilización se ha usado también con microorganismos prebióticos y procesos de producción de antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas y alcoholes (Park & Chang 2000).

El uso de células inmovilizadas en los procesos industriales ofrece numerosas ventajas en contraste con las células libres tales como: una reducción en el costo de procesamiento biológico, debido a la facilidad de reutilización celular; una menor posibilidad de contaminación, mantenimiento de una alta densidad celular y una reducción de los costos de procesos de separación de sustratos y purificación (Barik 2014; Park & Chang 2000; Ramakrishna & Prakasham 2009)

Las ventajas asociadas al proceso de inmovilización no solo se relacionan con su facilidad de manejo, sino a la generación de un microambiente alrededor de las esferas que genera condiciones distintas para el microorganismo, ocasionando cambios en su actividad metabólica diferentes a los que se presentan en un proceso de fermentación con células suspendidas o libres. En la tabla siguiente se resumen características encontradas en distintos sistemas de inmovilización principalmente con levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1-2: Efecto del proceso de inmovilización en distintos microorganismos

Característica observada	microorganismo	Sistema de inmovilización
Incremento a la tolerancia de etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	k-carragenina
Incremento a la tolerancia de	<i>Saccharomyces</i>	silano polihidroxilado

13 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

solventes orgánicos	<i>cerevisiae</i>	
Incremento a la tolerancia de nitrilos y amidas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de bario
Protección contra sustancias inhibitorias	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de calcio
Retención de una elevada actividad metabólica durante largos periodos de fermentación	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de calcio
Incremento en la producción de etanol.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de calcio
Incremento en la producción de etanol	<i>Saccharomyces bayanus</i>	k-carragenina
Incremento en producción de penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	k –carragenina
Cambios en la producción de metabolitos secundarios	<i>Fusarium moniliforme</i>	alginato, carragenina Poliuretano

Adaptado de: Fermentation Microbiology and Biotechnology Third Edition: (E.M.T. *et al.* 2012)

1.3.1 Métodos de inmovilización

Diferentes métodos de inmovilización se aplican a enzimas, organelos celulares, microorganismos, células animales y vegetales; con el fin de encerrar el biocatalizador en un espacio definido de tal manera que conserven sus actividades y pueden ser reutilizadas varias veces durante un largo período de tiempo (Peinado *et al.* 2006). El proceso de inmovilización puede darse de dos formas: 1) por métodos químicos, que dependen de la formación de un enlace covalente, de la fijación a una matriz insoluble e inerte con un reactivo multifuncional, o de la incorporación a la formación de un polímero (co-polimerización) o 2) mediante métodos físicos, ya sea por adsorción sobre una matriz insoluble o por atrampamiento dentro de geles, fibras o microcápsulas (Mammarella 2001).

Los metodos de inmovilizacion fisicos mas estudiados se describen a continuacion:

Atrapamiento a una superficie: corresponde a la unión o adsorción en las superficies de soportes sólidos siendo este uno de los métodos de inmovilización más simples (Barik, 2014; Pilkington *et al.*, 1998). Este procedimiento aprovecha la capacidad que muchos microorganismos poseen de adherirse a un gran número de superficies en la naturaleza (Kourkoutas *et al.* 2004).

En este tipo de inmovilización, las células pueden unirse a una gran variedad de materiales usados como soporte. Este proceso puede darse usando agentes de unión como óxidos metálicos o glutaraldehido; sin embargo este tipo de agentes no son recomendados en la fabricación de bebidas o en la producción de etanol ya que pueden ser perjudiciales o contaminantes; se prefiere un proceso de adhesión natural ya que es un método simple, pero al no existir una barrera entre las células y la solución se puede dar fácilmente un desprendimiento de las células (Verbelen *et al.*, 2006).

Atrapamiento dentro de matrices porosas: es un método irreversible donde una matriz semipermeable, permite el intercambio entre el medio interior y exterior (Pilkington *et al.* 1998; Barik 2014). Este tipo de atrapamiento se puede dar de dos maneras: en la primera las células se dejan dentro de una matriz de característica porosa preformada esperando que cuando las células se reproduzcan se atrapen dentro de la matriz al obstaculizarse entre ellas mismas (Verbelen *et al.* 2006). Una segunda forma consiste en crear una matriz porosa alrededor de las células mediante hidrogeles poliméricos naturales y sintéticos como alginato de calcio, kappa-carragenina o agar (Lozinsky *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014; King & Zall, 1983). Estas perlas poliméricas son por lo general esféricas con diámetros que van de 0,3 a 3 mm.

Con este tipo de atrapamiento se puede obtener altas cargas de biomasa, sin embargo un atrapamiento en gel ha tenido poco uso en la fermentación industria dadas las limitaciones a la difusión de nutrientes y metabolitos debido a la matriz de gel y la alta densidad celular en las perlas y la inestabilidad física del gel y la no regeneración de las perlas, lo que puede generar altos costos en este tipo de inmovilización (Verbelen *et al.* 2006); no obstante es una de las técnicas de inmovilización más utilizadas usándose polímeros como carbohidratos, proteínas o productos sintéticos orgánicos e inorgánicos. Cuando se utilizan carbohidratos como matriz de inmovilización, los dos tipos de

polisacáridos más frecuentemente utilizados son: la celulosa junto con sus derivados y los geles (agar, alginato, carragenina y la pectina extraída de frutas). Polisacáridos como agar, alginato y carragenina tienen características importantes como simular las condiciones físicas encontradas en las células microbianas y conferir estabilidad para células y enzimas; sin embargo, el agar es inestable a altas temperaturas y el alginato de calcio es inestable en presencia de agentes químicos como sales de potasio; la celulosa por su parte no es soluble en agua pero es soluble en solventes orgánicos polares (Phillips & Poon, 1988).

Los polisacáridos como el alginato y la carragenina, producen soluciones de alta viscosidad y permiten la formación de geles. Cuando se encuentran en solución, las cadenas lineales de polisacáridos se encuentran en forma desordenada, mientras que con la adición de un catión forman una matriz con una estructura específica, debido a las interacciones entre cadenas y el catión (puentes de hidrógeno, interacciones entre dipolos, iónicas y de solvatación) (Mammarella 2001).

Atrapamiento detrás de una barrera: en este tipo de atrapamiento las células son atrapadas en microcápsulas o en filtros de membrana microporosa. Este método es usado cuando se requiere un producto elaborado libre de células o cuando los productos de alto peso molecular necesitan ser separados del efluente; sin embargo se presentan problemas de transferencia de masa y ensuciamiento de la membrana ocasionado por el crecimiento de las células; este tipo de inmovilización es atractivo en términos de productividad, pero tiene una baja relación costo/beneficio (Verbelen *et al.*, 2006).

Atrapamiento por floculación: las células microbianas tienden a formar agregados de forma natural, condición que también se puede denominar como inmovilización. Muchos procesos industriales importantes ocurren durante el metabolismo secundario por parte de pellets de microorganismos. Estos agregados microbianos se pueden encontrar en la elaboración del vino y de la cerveza, en donde las células de levadura floculan al final de la fermentación; el cultivo de algas y de células animales y vegetales también puede sufrir este fenómeno. (E.M.T. *et al.* 2012).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tiene la capacidad natural de adherirse a superficies inertes, así como otras células por el proceso de floculación (Verbelen *et al.*,

2006) Para muchas aplicaciones industriales en las que esta levadura se utiliza, por ejemplo, la producción de cerveza, vino o alcohol, el comportamiento de floculación es sin duda una de las características más importantes de una buena cepa de producción. La floculación es un proceso muy complejo que depende de la expresión de genes específicos, influenciado por el estado nutricional de la célula o condiciones de estrés. Durante los procesos de fermentación industrial, la floculación se ve afectada por numerosos parámetros tales como las condiciones de nutrientes, oxígeno disuelto, pH, temperatura de fermentación, manipulación de la levadura y condiciones de almacenamiento; en teoría, el uso racional de estos parámetros ofrece la posibilidad de obtener el control sobre el proceso de floculación; sin embargo, la floculación es un fenómeno específico de una cepa, por lo que es difícil predecir su comportamiento (Verstrepen *et al.*, 2003).

1.3.2 Matrices porosas usadas en procesos de inmovilización

Cuando se trabaja con células inmovilizadas es importante la elección del material de soporte y el procedimiento a seguir para la inmovilización. Las características de un soporte ideal son: una gran superficie por unidad de volumen y alta permeabilidad para productos y sustratos, grupos funcionales para la inmovilización, elevado carácter hidrofílico, insolubilidad en agua, estabilidad química y térmica, resistencia mecánica, resistencia al ataque microbiano, posibilidad de regeneración, no tóxico, de bajo precio y compatible con el biocatalizador (Mammarella 2001; Wijffels 2001).

Cada tipo de material utilizado para la inmovilización presenta propiedades únicas que se verán reflejadas en las características de las esferas formadas, tales como su resistencia a la deformación o las propiedades de transferencia de masa interna esenciales para operaciones de modelamiento, diseño y escalado de procesos (Wijffels, 2001). Las condiciones de solubilidad, biodegradabilidad y difusividad deben ser evaluadas al igual que los costos que generan cada tipo de inmovilización.

Entre los polisacáridos más usados comúnmente para la inmovilización celular se encuentran: alginato, pectato, carragenina, agar, y quitosano. Algunas características importantes de estos compuestos se describen a continuación.

Alginato: es un polisacárido de origen natural extraído de diversas especies de algas pardas (*Phaeophyceae*), incluyendo *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Macrocystis* y también de bacterias como *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Barik, 2014). Este polímero tiene gran uso en la industria de la biotecnología y ha sido utilizado con éxito durante muchos años en la industria de alimentos y bebidas como un agente espesante, gelificante y como estabilizador coloidal. Este biopolímero también tiene varias propiedades únicas que le han permitido ser usado como una matriz para el atrapamiento de una variedad de proteínas y células (Gombotz & Wee, 2012). Entre las principales propiedades del alginato se encuentran: permitir un proceso de encapsulación a temperatura ambiente, presentar una alta porosidad del gel que permite altas velocidades de difusión de macromoléculas, capacidad de controlar esta porosidad con procedimientos de revestimiento simples y la biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales (Gombotz & Wee 2012).

Químicamente los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados que contienen cantidades variables de ácidos D-manurónico y L-gulurónico. La estructura química puede variar ampliamente en la composición y secuencia y están dispuestos en un patrón de bloques a lo largo de la cadena. Estas regiones homopoliméricas de bloques de ácido β -D-manurónico y bloques de ácido α -L-gulurónico se intercalan para formar la estructura ácido β -D-manurónico ácido α -L-gulurónico, la composición y la extensión de las secuencias, así como el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos (Gombotz & Wee, 2012).

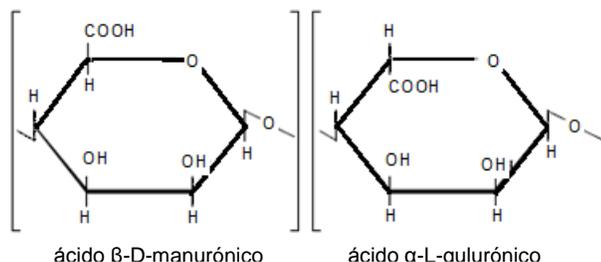


Ilustración 1-1: Unidades monoméricas del ácido alginico

La capacidad del alginato para gelificar y su proceso relativamente sencillo han permitido inmovilizar proteínas y células al ser incorporados en esta matriz con retención

de la actividad biológica. Mediante la selección de este tipo de biopolímero y de revestimiento, se puede controlar el tamaño de poro así como la velocidad de degradación y de liberación (Gombotz & Wee 2012).

El alginato gelifica como alginato de calcio en un medio rico en calcio; estos iones incrementan la resistencia del gel hasta un valor máximo a partir del cual un aumento en su concentración no ejerce más influencia en la resistencia de la esfera (Mammarella 2001).

Pectato: las pectinas son polisacáridos contenidos en plantas con diversas aplicaciones en la industria de alimentos; una de sus principales propiedades es su capacidad para la formación de geles en presencia de iones de calcio, formando una red tridimensional con capacidad de retener agua y proporcionar soporte mecánico.

Al igual que con el alginato, el pectato es un medio de inmovilización simple que proporciona condiciones suaves y fisiológicas para el atrapamiento de células. En comparación con los geles de alginato los geles de pectato de calcio son menos sensibles a iones y agentes químicos que destruyen las perlas, con una constante de estabilidad mayor en casi un orden de magnitud al alginato (Gemeiner *et al.*, 1996; Mimmo *et al.*, 2005).

Carragenina: la carragenina es un hidrocoloide formado por unidades alternas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG) unido por enlaces glucosídicos α -1,3 y β -1,4; La carragenina se clasifica en varios tipos tales como λ , κ , ι , ϵ , μ , que contiene entre 22% a 35% de un grupo sulfato.(Necas & Bartosikova, 2013).

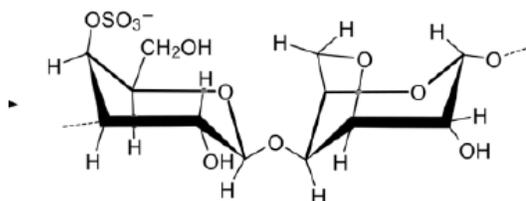


Ilustración 1-2: Estructura carragenina Fuente: (Necas & Bartosikova, 2013).

Los geles de kappa carragenina se caracterizan por ser firmes y rígidos, mientras que los producidos con iota son inconsistentes y flácidos; si bien la lambda carragenina no

gelifica en agua, interactúa fuertemente con las proteínas para estabilizar un amplio rango de productos lácteos; gracias a su propiedad de gelificar esta matriz se puede utilizar en los procesos de inmovilización. (Wijffels, 2001).

Químicamente cuando se combina un polielectrolito (como carragenano) con un ion uni o multivalente de la carga opuesta, puede formar un hidrogel que se puede degradar y finalmente desintegrar y disolver manteniéndose unidos por medio de redes moleculares y/o fuerzas secundarias (iónica, enlaces de hidrógeno o fuerzas hidrofóbicas); todas estas interacciones son reversibles, y pueden romperse mediante cambios en las condiciones físicas, tales como fuerza iónica, pH, temperatura, aplicación de estrés, o la adición de solutos específicos (Sankalia *et al.*, 2006).

El cloruro de potasio es una de las principales sales usadas para inducir la gelificación y ha sido usado por distintos autores en concentraciones cercanas a 0,3 M; sin embargo en algunos casos la carragenina se disuelve en solución salina para mejorar la solubilidad en agua fría (Imeson, 1997). El proceso de inmovilización con carragenina puede verse afectado por la necesidad de manejar el polímero a una temperatura relativamente alta (45 °C) que podría ocasionar daños en la estructura de las células a inmovilizar (Wijffels, 2001).

1.3.3 La producción de alcohol por células inmovilizadas

El uso de células inmovilizadas en la fermentación alcohólica ha sido uno de los sistemas más evaluados en investigación (Ghorbani *et al.*, 2011; Ramakrishna & Prakasham, 2009; Watanabe *et al.*, 2012). Este tipo de células a nivel industrial presentan ventajas tales como la facilidad de reutilizar el biocatalizador durante tiempos prolongados en fermentaciones por lotes y reducción de contaminación microbiana (Kourkoutas *et al.*, 2004).

El efecto causado por el proceso de inmovilización en la levadura está relacionado con modificaciones en sus procesos fisiológicos y metabólicos. Un estudio de la expresión genética, que expresa la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al encontrarse inmovilizada durante el proceso de fermentación de cerveza, demostró que este proceso afecta varias propiedades fisiológicas celulares, indicando que si bien ciertos genes

relacionados con el estrés se activan en las células inmovilizadas por la escasez de nutrientes y el estrés osmótico, marcadores genéticos relacionados muestran que las células inmovilizadas acumulan solo un 26 % del compuesto trehalosa (relacionado con el estrés celular) en comparación con las células libres lo cual es una ventaja para el proceso de inmovilización (Shen *et al.* 2003). Igualmente se ha demostrado el efecto positivo de la inmovilización celular al ampliar el intervalo de pH en el que las levaduras pueden metabolizar los azúcares para la producción de etanol, en comparación con las células libres (Buzás *et al.*, 1989).

Los resultados del uso de células inmovilizadas en procesos de fermentación alcohólica son diversos y están relacionados con el medio y las condiciones de fermentación, relacionándose a continuación algunos estudios de interés:

Yu *et al* 2007 estudiaron la inmovilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en bagazo de sorgo para la producción de etanol donde se reporta un aumento en la productividad en más del 100% con respecto al mismo proceso con células libres. Una concentración de etanol de más del 11% con respecto a células libres usando melaza como sustrato también ha sido reportada, lográndose usar las levaduras en cinco ciclos consecutivos (Rattanapan *et al.*, 2007). Najafpour *et al* 2004 por su parte, reportan un mejoramiento en el parámetro de rendimiento al utilizar células inmovilizadas.

Estas células también han sido usadas para la producción de la cerveza, donde exhibieron una alta actividad de fermentación en pruebas de laboratorio y a escala piloto (Bezbradica *et al.*, 2007). También se ha estudiado la influencia de la inmovilización de la levadura en la fermentación y la reducción de aldehídos durante la producción de la cerveza sin alcohol (va Iersel *et al.*, 2000).

Respecto a la producción de vino existen investigaciones encaminadas al uso de células inmovilizadas para su elaboración. Kourkoutas *et al.* 2003 reportan el uso de trozos de membrillo como soporte para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando estabilidad operacional sin detectarse disminución en su actividad, incluso trabajando a bajas temperaturas. También se han usado pellets de gluten, los cuales mostraron mejores resultados en comparación con el uso de células libres a bajas temperaturas (Iconomopoulou *et al.*, 2002). Igualmente uvas pasas secas fueron utilizadas para crear

un biocatalizador usado en la elaboración de vino blanco el cual era adecuado para trabajar a una temperatura ambiente (15 – 25 °C) logrando además una buena estabilidad operativa (más de 4 meses continuos) (Tsakiris *et al.*, 2004).

1.4 La miel como materia prima para la fermentación alcohólica

La miel es la sustancia natural producida por las abejas a partir del néctar de flores o sustancias azucaradas de plantas; este material recolectado por ellas es transformado en miel en sus panales tras un complejo proceso de maduración (ICMSF 2015).

Cuando la miel es producida a partir de flores se puede clasificar en monofloral si el producto final procede totalmente o en su mayoría de una sola planta, conservando características organolépticas, fisicoquímicas y microscópicas propias de esta; o denominándose multifloral cuando procede de varias especies vegetales. La miel también puede ser producida a partir de excreciones de insectos succionadores de plantas o de secreciones de partes vivas de las plantas a la cual se la denomina miel de mielada o mielato. (Ministerio de la Protección Social 2010).

1.4.1 Composición química de la miel

Respecto a la composición química de la miel esta es una mezcla de diferentes compuestos, incluyendo fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa, proteínas, aminoácidos, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, pigmentos, vitaminas y minerales, que varía de acuerdo a la flora colectada, la dinámica enzimática y procesamiento de la fuente botánica por parte las abejas y a las condiciones ambientales, de cosecha, envasado y almacenamiento (Gamboa 2014).

Carbohidratos: los carbohidratos son el componente principal en la miel, y dependiendo de su origen (néctar de flores o mielato) existen diferencias entre ellas. La miel de mielato presenta mayores concentraciones de las azúcares predominantes (fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa) así como de otros compuestos indeterminados que hacen de esta una matriz más compleja que la miel floral (Valbuena 1992).

Los monosacáridos glucosa y fructosa se encuentran en promedio entre el 38% y 31 % de la miel respectivamente siendo estos los azúcares más predominantes; sin embargo

existen más de 20 di y oligosacáridos con predominio de la maltosa; la composición de disacáridos depende en gran parte del origen de los que proceda la miel (Belitz *et al.* 2009).

Agua: el agua es el segundo componente en importancia después de los carbohidratos, en la miel esta debe ser inferior a 20 %; Una miel con mayor contenido de agua es fácilmente susceptible a la fermentación por levaduras osmofílicas, siendo poco común a concentraciones inferiores a 17,1 %, mientras que entre 17,1 y el 20 % el proceso de fermentación depende de brotes de las levaduras osmofílicas (Belitz *et al.* 2009).

Los ácidos: el ácido orgánico principal en la miel es el ácido glucónico, que resulta de la actividad de la enzima glucosa-oxidasa. Su concentración depende principalmente del tiempo transcurrido entre la recolección de néctar por las abejas y la formación de miel en la colmena. Otros ácidos presentes en proporciones más pequeñas son: acético, butírico, láctico, cítrico, succínico, fórmico, maleico, málico y oxálico (Belitz *et al.* 2009).

1.4.2 Potencial antimicrobiano de la miel

Cuatro factores contribuyen mayormente a la seguridad y estabilidad microbiológica de la miel: la baja actividad de agua, un bajo pH, presencia de peróxido de hidrógeno y otras sustancias antimicrobianas presentes en la miel. La baja actividad de agua otorga propiedades higroscópicas que permiten a partir del principio de osmosis extraer el agua de las células bacterianas y provocar su muerte; Igualmente el pH ácido de la miel que se puede encontrar entre 3.2 y 4.5 es lo suficientemente bajo para ser inhibitorio a agentes patógenos ya que su pH óptimo se encuentra entre 7.2 y 7.4. (Gupta *et al.* 2014).

La producción de peróxido de hidrogeno producto de la oxidación enzimática de la glucosa confiere a la miel propiedades microbicidas, este proceso se produce mejor en mieles no maduras o diluidas presentándose muy lentamente en mieles con poco contenido de agua; el peróxido rápidamente se descompone en agua más oxígeno permaneciendo en la miel en concentraciones estables bajo ciertas condiciones de temperatura y concentraciones de azúcar que permiten inhibir el crecimiento de los microorganismos asegurando la protección de la miel (Valbuena 1992). A otros

productos químicos detectados en la miel tales como pinocembrina, terpenos, alcohol bencílico, 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico (ácido siríngico), metil 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato de metilo, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, 2-hidroxi-ácido 3-fenilpropiónico, ácido 2-hidroxibenzoico y 1,4-dihidroxibenceno se les atribuye parte de la actividad antimicrobiana de la miel (Gupta *et al.* 2014).

1.5 Hidromiel

El hidromiel es una bebida alcohólica tradicional conocida desde la antigüedad. Se obtiene por la fermentación de miel diluida mediante el uso de levaduras y algunas clases de bacterias. Para algunos países productores de miel, la elaboración de hidromiel se plantea como una alternativa cuando existe un exceso de producción; sin embargo, la mayoría de las veces no se produce de una forma estandarizada, sino empírica y manual (Gomes *et al.* 2011). La fermentación y maduración requiere un período prolongado y las características del producto final son variables (Gomes *et al.* 2013; Iglesias *et al.* 2014; Ramalhosa *et al.* 2011; Roldán *et al.* 2011). La miel de la que procede esta bebida influye en las características del producto fermentado, considerando la complejidad de azúcares, minerales, enzimas, vitaminas, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, flavonoides y otros componentes bioactivos presentes (Srimena *et al.* 2013).

La producción de hidromiel se enfrenta a varios problemas, entre ellos el retraso o detenimiento de la fermentación y la generación de sabores desagradables asociados con la respuesta a condiciones de estrés durante el crecimiento de la levadura, causados por una alta concentración de azúcar del mosto, alta presión osmótica del medio, la procedencia de la miel, la temperatura, el pH, la composición del medio (contenido de vitaminas y nitrógeno) y el tipo de levadura utilizada; Igualmente la contaminación del mosto por otro tipo de microorganismos puede cambiar su calidad organoléptica y ocasionar poca uniformidad en el producto final, factores que han llevado a reducir la producción de hidromiel a lo largo de los años y ser reemplazado por otro tipo de bebidas (Gomes *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013; Ramalhosa *et al.*, 2011). Se han realizado una serie de investigaciones encaminadas a mejorar estas problemáticas, enfocándose en estudios con diferentes cepas de levadura, adecuaciones del mosto y métodos para su higienización.

En Colombia la producción de hidromiel es empírica, sus principales productores son los mismos apicultores quienes intentan diversificar su mercado; sin embargo en muchos de los casos no escapan de los inconvenientes mencionados anteriormente. Dada la casi nula producción de este tipo de bebida no existe una legislación para este producto lo cual dificulta aún más su comercialización.

La Universidad Nacional de Colombia ha sido una de las instituciones pioneras en generar investigación científica encaminada a entender el proceso de fermentación alcohólica de miel en Colombia. Acosta (2012) desarrolló un estudio para determinar las condiciones de fermentación adecuadas según la productividad y rendimiento de etanol generado; donde se demostró que con una dilución de miel de 17°Brix y el uso de fosfato de amonio monobásico se obtienen los mejores resultados para grado alcohólico, rendimiento y productividad. En el mismo año Blanco et. al (2012) evaluaron la adición de diferentes fuentes de nitrógeno al mosto y determinaron que el uso de sulfato de amonio y extracto de levadura mejoran los tiempos de fermentación. Igualmente Hernández (2014) al evaluar diferentes condiciones de proceso, encontró los mejores resultados usando: una concentración de 24 °Brix, una temperatura de 30 °C, polen como fuente de nitrógeno y la pasteurización como método de higienización. En el mismo año, se reporta un estudio comparativo para condiciones de pH y polen como fuente de nitrógeno, obteniéndose los mejores resultados cuando el pH no era ajustado en la fermentación.

Por otra parte, la inclusión de hierbas aromáticas en la fermentación de hidromiel también ha sido estudiada. Cuenca *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la utilización de diferentes especias: clavo, ají y una mezcla de las dos bajo las mismas condiciones. Todas las fermentaciones realizadas presentaron un comportamiento estadísticamente diferente a lo largo del tiempo para todas las variables evaluadas. Blanco (2014) usó agraz en el proceso de fermentación y reporta que el uso de fosfato di-amonio presenta ventajas en cuanto a un menor tiempo de fermentación en relación al uso polen como fuente de nitrógeno. Un año después el mismo autor reporta el uso de hierbabuena, limonaria y canela, manteniéndose los tiempos de fermentación y presentándose un incremento en los grados alcohólicos al igual que en ciertos compuestos fenólicos (Blanco *et al.* 2015). Por otra parte, además de los estudios con miel de *Apis mellifera*, se han realizado estudios con abejas nativas (abejas sin aguijón) encontrándose resultados satisfactorios en la producción de hidromiel (Blanco & Cuenca 2014).

1.5.1 Condiciones de proceso en la elaboración de hidromiel

El proceso de elaboración de hidromiel requiere al igual que otro tipo de fermentaciones alcohólicas, del establecimiento de condiciones adecuadas relacionadas especialmente con el tipo de microorganismo, las características del mosto o sustrato de fermentación, higienización, adecuación de pH y contenido de nutrientes requeridos por el microorganismo y del mantenimiento de condiciones ambientales, tales como la temperatura y ausencia de oxígeno. Si bien el proceso de fermentación alcohólica de miel es similar a la elaboración de una bebida tipo vino, existen diferencias entre ellas que obligan a estudiar por separado las condiciones necesarias para la obtención de un producto de calidad y económicamente viable.

Las condiciones iniciales del mosto influyen notoriamente en el producto final. En la tabla 1-3 se reportan las principales características y condiciones de manejo del mosto usadas en el proceso de elaboración, así como el tipo de microorganismo utilizado y los tiempos promedio de fermentación.

Dentro de estas condiciones el control de pH es un factor importante para el desarrollo de la fermentación y dado que la miel tiene un pH naturalmente bajo este puede caer hasta un punto que limita la actividad de la levadura la cual presenta un pH óptimo cercano a 4 (Ramalhosa *et al.*, 2011), por lo que la aplicación de un buffer que mantenga el pH entre 3,7 y 4,0 puede ser recomendable (McConnell & Schramm, 1995).

Con respecto al tipo de miel que se utiliza para la fabricación de hidromiel, esta puede influir en el producto final así como lo hacen los suplementos añadidos (Pereira *et al.*, 2009). Prasad *et al.* (2013) reportan diferencias significativas en cuanto acidez titulable, azúcares totales y reductores al evaluar el proceso fermentativo usando tres tipos de miel: floral, eucalipto y girasol.

Tabla 1-3: Condiciones del mosto, tipo de microorganismo utilizado y tiempo de fermentación reportados en literatura para la elaboración de hidromiel.

Concentración de sólidos solubles	Célula utilizada para su inoculación	°C	Fuente de nitrógeno	Método de Higienización	Días	pH del mosto	Referencia
17 ° Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i>	25	Fosfato de amonio monobásico. (0.4g/L)	Metabisulfito de sodio (100pm)	NR	3.8	(Acosta 2012)
395 g/L	<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i> PB2002 (30 g/hL)	20, 25,30 óptimo 24	Nutriente comercial. (90- 60 - 120 g/hL óptimo 88 g/ L)	Dióxido de azufre (8 g/hL)	NR	NR	(Gomes <i>et al.</i> 2013)
395 g/L	Cepa aislada de miel (30 g/hL) Cepa comercial recomendada: levadura Fermol ® Reims Champagne	24 a 29	Enovit (85 y 100 g / hL recomienda 60 g/hL)	Dióxido de azufre (8 g/hL)	13	3.5	(Gomes 2010)
37 g /100 ml (miel/agua) 22 ° Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UCD522. (105 UFC/mL)	22	NR	65 °C por 10 min	NR	3.5 - 4.72	(Mendes-Ferreira <i>et al.</i> 2010)
Relación 1:3 (miel: agua)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> C11-3	óptima: 30	Vitamom ultra	120 °C por 20 min	NR	NR	(Marián Navrátil <i>et al.</i> 2001)
(37% w / v)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin	25	Fosfato	65° C por 10 min	NR	3.71	(Pereira <i>et al.</i>

27 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

23 ° Brix	QA23, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin ICV D47 (108 UFC / mL)		diamónico (267 mg/L)				2014)
	siete cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (105 células / mL)	27	NR	Dióxido de azufre	8 -13	NR	(Pereira <i>et al.</i> 2009)
(37% w / v) 23 ° Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin QA23 y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin ICV D47. (108 UFC / mL)	22	Fosfato diamónico (277 mg / L)	65 ° C por 10 minutos.	NR	3.7	(Pereira <i>et al.</i> 2013)
20 - 22 ° Brix	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ENSIS-LE5 (15 g / hL)	25	Polen: (10, 20, 30, 40 y 50 g / L)	Metabisulfito de potasio (50 mg/ L)	NR	3.6	(Roldán <i>et al.</i> 2011)
Relación 1: 2 (v/ v)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> raza Johannisberg-Riesling (JR) (0,5 g / L)	20 a 22	Fosfato diamónico (0,4 g / L)	60 °C 10 min	30	NR	(Sroka & Tuszyński 2007)
21° Brix	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	22	NR	60 °C por 10 minutos + Metabisulfito de sodio (100 ppm)	30	NR	(Wintersteen <i>et al.</i> 2005)
30° Brix	Levadura Angel yellow rice	20	Urea (0,3%) fosfato de amonio terciario (0,1%)	NR	20	3.9	(Mangmang <i>et al.</i> 2012)

1:3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>sensu stricto</i>	25	NR	NR	25 -30	3.01- 3.39	(Caridi <i>et al.</i> 1999)
	<i>Saccharomyces cerevisiae:</i> <i>Fermol® Reims Champagne y</i> <i>ICV® D47</i>	20, 25 30	Sal de amonio (60, 90 y 120 g/hL)				(Gomes <i>et al.</i> 2011)
		24-32, óptimo 28	fosfato diamónico (90-150g / hL óptimo 150 g / hL)			4-6 (óptimo 6.5)	(Zhang <i>et al.</i> 2014)

NR: Dato no reportado

1.5.2 Azúcares fermentables para la elaboración de hidromiel

El hidromiel se produce usando una solución diluida de miel como fuente de carbono para las levaduras, obtenida mediante la adición de una cantidad adecuada de agua o zumo de fruta. De acuerdo con el tipo de solución que se utilice para diluir la miel, el producto resultante se puede nombrar de diferentes maneras: Pyments, cysers, melomels, y metheglin, en los cuales incluye la adición de uvas, manzanas, otras frutas y especias, respectivamente (Ramalhosa *et al.* 2011). El producto resultante se ve influenciado por el tipo de miel utilizada, además se ha observado que la fermentación se favorece en mieles oscuras debido a su mayor contenido de micronutrientes en relación con las mieles de colores claros (Gupta & Sharma 2009).

La miel puede ser diluida en distintas proporciones miel: agua o miel: jugo de fruta, por ejemplo, 1:0.5; 1:1; 1:2 y 1:3 (Caridi *et al.* 1999; Ramalhosa *et al.* 2011); esto implica, diferentes concentraciones iniciales de azúcares (°Brix) para el mosto, que han sido reportados por diferentes investigadores: 12 ° Brix (Roldán *et al.*, 2011), 18 °Brix (Qureshi & Tamhane, 1985), 23 ° Brix (Pereira *et al.*, 2014), 19 a 21 ° Brix, 30 ° Brix (Mangmang *et al.*, 2012) 22 ° Brix (Xiao-man *et al.*, 2009), 395 g/l (Gomes *et al.*, 2013) y 375 g/l (Barrios *et al.*, 2010) . En general la concentración de azúcares iniciales en el mosto debe permitir el desarrollo adecuado de la fermentación, donde un valor alto podría inhibir el crecimiento de la levadura; igualmente el valor inicial trabajado estará relacionado directamente con la concentración final de etanol que se desee obtener.

1.5.3 Fuente de nitrógeno

Al igual que los compuestos de carbono asimilables por la levadura durante la fermentación, los compuestos de nitrógeno son de gran importancia y esenciales para su crecimiento y metabolismo; sin embargo, dado que la miel es una fuente pobre de nitrógeno, sus fermentaciones son notoriamente lentas. La adición de nutrientes para la levadura es relevante para promover una rápida y completa fermentación (Gomes *et al.*, 2010; McConnell & Schramm, 1995). Igualmente, los bajos niveles de minerales presentes en la miel y por ende en el mosto, esenciales para la multiplicación de la levadura, afectan negativamente a la evolución del proceso (Kempka & Mantovani, 2013).

Debido a la gran importancia que presenta el nitrógeno en el proceso fermentativo para la industria vinícola, fuentes como las sales de amonio o extracto de levadura son usados comúnmente para completar las deficiencias presentes en el mosto. La dosis recomendada de nitrógeno se encuentra en 190 mg de nitrógeno por litro, la cual debe ser preferiblemente adicionada al inicio de la fermentación (Bely *et al.*, 2003).

Roldan *et al.* (2011) evaluó el uso de polen como fuente de nitrógeno durante el proceso fermentativo, encontrando mejoras en el rendimiento y la eficiencia de la fermentación, incrementando estos parámetros por encima de un 7% y 10% respectivamente respecto al control (sin fuente de nitrógeno); además de un aumento en los contenidos volátiles de los lotes producidos y un mejor perfil sensorial con una dosis óptima de 30 g/hl. Kempka & Mantovani (2013) logro una disminución del tiempo de fermentación de 168 a 72 horas con el uso de polen. Blanco *et al.* (2012) evaluó el uso de sulfato de amonio, fosfato diácido de amonio, extracto de levadura y polen apícola encontrando que en las fermentaciones realizadas a 25°C usando *Saccharomyces cerevisiae*, el tiempo de fermentación se redujo en los mostos donde se había adicionado sulfato de amonio y extracto de levadura, en comparación al mosto sin adición de fuentes de nitrógeno.

1.5.4 Higienización del mosto

Además de la adición de nutrientes, el mosto debe someterse a tratamientos físicos y/o químicos para evitar el crecimiento de microorganismos indeseables. Entre los métodos de higienización más comúnmente utilizados están: la ebullición (Pereira *et al.* 2014; Ramalhosa *et al.* 2011; Ukpabi 2006), el uso de sales de metabisulfito de sodio o potasio (Pereira *et al.* 2009; Qureshi & Tamhane 1985), dióxido de azufre (0,08%) con y sin pre-tratamiento térmico (encontrándose mejores resultados sensoriales en el mosto con pre-tratamiento) (Ukpabi, 2006), dióxido de azufre (8 g/hl) (Gomes *et al.* 2013), adición de metabisulfito de potasio (50 mg/L), la pasteurización (Morales & Angelis 2013; Qureshi & Tamhane 1986; Roldán *et al.* 2011; Ukpabi 2006) y la ultrafiltración (Ramalhosa *et al.* 2011).

La pasteurización se reporta como uno de los métodos más recomendado, es más seguro, más rápido, requiere menos equipos que otros métodos y ofrece una mejor relación entre el saneamiento y pérdida de compuestos del aroma; una desventaja es

que las proteínas no se retiran y el hidromiel higienizado de esta forma puede requerir clarificación (McConnell & Schramm 1995).

1.5.5 Inoculación de la levadura

En un proceso fermentativo, se recomienda una tasa de inoculación de 10^6 - 10^7 células de levadura/ml, la óptima población de la levadura a la altura de la fermentación es de 10^8 células de levadura/ml; con una tasa de inoculación baja no se llega a la población óptima deseada y el proceso termina sin que todo el azúcar se fermente; mientras que una tasa de inoculación inicial más alta acelera la fermentación, pero también aumenta el costo del proceso (Jacobson 2006). En la mayoría de los casos reportados para hidromiel el medio de crecimiento se inocula con una población inicial entre 10^5 y 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml con o sin agitación a una temperatura entre 22°C y 25°C y un tiempo de fermentación entre 8 y 20 días (Chen *et al.* 2013; Gomes *et al.* 2013; Qureshi & Tamhane 1986; Wintersteen *et al.* 2005). Se han estudiado también múltiples inoculaciones con diferentes cepas de levadura, demostrándose que este método favorece el desarrollo de algunos compuestos aromáticos tales como 2-metiltetrahidrotiofe-3-ona, 1-propanol y acetato de 2-metilbutilo en el producto final; permitiendo la elaboración de un hidromiel con una calidad aceptable (Chen *et al.* 2013).

1.5.6 Microorganismos utilizados en la producción de hidromiel

Al igual que otro tipo de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza, en la producción de hidromiel para lograr el proceso fermentativo de una forma uniforme se requiere del uso de microorganismos específicos que transformen los azúcares en alcohol, proceso que originalmente se realizaba aprovechando la flora microbiana del medio natural bajo condiciones ambientales; sin embargo, debido a los altos contenidos de azúcar presentes en la miel (Kamal & Klein 2011) y su bajo contenido de nutrientes, la fermentación tiende a ser lenta si se da por condiciones naturales, requiriendo la adición de cepas de levadura, así como la adecuación de pH y temperatura. Las levaduras que se utilizan en la producción de hidromiel son generalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en la industria vinícola.

La selección de la cepa de levadura es importante, ya que influye en la eficiencia de la conversión de azúcar en alcohol y en las características sensoriales del producto final. A

razón de que los mostos para la fabricación de hidromiel, a diferencia del mosto de uva usado para la fabricación de vinos, presentan diferentes composiciones en relación con su contenido de azúcar y su concentración de nitrógeno, las cepas de levadura para la fabricación de vino no son necesariamente adecuadas para su producción; sin embargo han sido las más utilizadas en la fabricación de hidromiel (Ramalhosa *et al.* 2011).

Entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en investigaciones con hidromiel se encuentran: Lalvin QA23, Lalvin D47 (Gomes *et al.* 2013; Roldán *et al.* 2011), C11-3 escogida por su tolerancia a etanol (Marián Navrátil *et al.* 2001), BRL-7 usada por su capacidad de producir alcohol en altas concentraciones (Qureshi & Tamhane 1986), PB2002 (Gomes *et al.* 2013), UCD522 (Mendes-Ferreira *et al.* 2010) y levaduras usadas en la fabricación de champaña (Wintersteen *et al.* 2005). En Colombia, se han evaluado diferentes tipos de levadura en el proceso de fermentación y se ha encontrado mejores resultados con la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*, raza fisiológica *bayanus* (Uvaferm BC) (Acosta 2012). En otros países se ha usado otro tipo de levaduras como cepa de *Hansenula anomala*, la cual presenta alta producción y tolerancia a etanol, así como cepas comerciales usadas en panificación (Ukpabi, 2006). Cepas de *Saccharomyces sensus stricto* también fueron evaluadas en cuanto a su capacidad para fermentar mosto de miel (Caridi *et al.* 1999).

Con el objetivo de estudiar cepas diferentes a las tradicionalmente usadas en la fermentación, Pereira *et al.*, (2009) evaluó la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de miel, así como una cepa de laboratorio y una cepa de vino comercial no encontrándose diferencias en los productos obtenidos. . El aislamiento de levaduras también fue realizado desde Ogol, el cual corresponde al nombre dado a un vino de miel etíope; estas levaduras fueron comparadas en la elaboración de hidromiel con cepas comerciales (*Saccharomyces cerevisiae* W4 y *Saccharomyces cerevisiae* K7) (Teramoto *et al.* 2005). Un estudio similar fue reportado por Ying *et al.* (2013), quienes aislaron cepas de miel natural y las evaluaron mediante pruebas de tolerancia y rendimiento de alcohol. El uso de cepas mixtas también ha sido utilizado generando un producto con bajo contenido de alcohol (Zhou *et al.* 1993).

1.5.7 Características fisicoquímicas del producto final

El tipo de miel, las características del medio y los microorganismos utilizados, así como las condiciones de adecuación del mosto influyen sobre el rendimiento, la productividad y las características sensoriales y fisicoquímicas durante la fabricación de hidromiel. Existen ciertos parámetros indispensables que se deben medir en una bebida tipo vino, los cuales normalmente están regulados por normatividad en cada país siendo los principalmente evaluados el grado alcohólico, la acidez volátil y la acidez total.

En la tabla 1-4 se describen de manera resumida diferentes resultados obtenidos en investigaciones con hidromiel para los parámetros de grado alcohólico, pH, acidez total y volátil.

Tabla 1-4: Características fisicoquímicas de hidromiel en los parámetros de grado alcohólico, pH, acidez total y volátil reportados en literatura.

Etanol % (v/v)	pH	Acidez total g/L (ácido tartárico)	Acidez volátil (g/L) (ácido acético)	Referencias
10	3.2	4.2	0.5	(Acosta 2012)
10.20	NR	NR	0.54	(Gomes <i>et al.</i> 2013)
10.7 - 11.4	3.27- 3.67	3.1 a 7.7	0.51 a 0.84	(Mendes-Ferreira <i>et al.</i> 2010)
10.87	3.6 -3.67	6.58 a 6.96	0.34 a 0.43	(Pereira <i>et al.</i> 2014)
12.2 - 13.2			0.3	(Pereira <i>et al.</i> 2009)
10.03 - 10.33	3.66 - 3.7	6.68 - 7.76	0.25 -1.38	(Pereira <i>et al.</i> 2013)
9.04 - 12.39	2.95 - 4.05	3.15 - 4.87	0.43 - 1.3	(Roldán <i>et al.</i> 2011)
0.6 - 11.5	2.74 - 3.23	1.9 - 3.89	0.32 - 0.91	(Wintersteen <i>et al.</i> 2005)
6 - 8	NR	NR	NR	(Senyan <i>et al.</i> 2010)
11.92-13.26	NR	3.17-7	0.75-0.79	(Šmogrovičová <i>et al.</i> 2012)
7.2 -13.5	3.01-3.39	1.29 a 3.06	0.8 -2.4	(Caridi <i>et al.</i> 1999)

NR: no reporta

1.5.8 Características sensoriales

Las características sensoriales del producto final están influenciadas por diferentes factores; entre ellos el tipo de miel que se use en el proceso fermentativo ya que una miel contaminada afecta notoriamente al producto final (Caridi *et al.* 1999). El uso de especias

y jugos de fruta añadidos otorgan características sensoriales y mejoran los contenidos de compuestos fenólicos (Kahoun *et al.* 2008; Katoh & Koguchi 2011). Lee *et al.* (2012) evaluaron la producción de hidromiel con diferentes mieles (miel de acacia, miel de castaño, miel de cítricos y miel de flores) obteniendo un producto con diferentes concentraciones finales de etanol y encontrándose diferencias con respecto a sus propiedades sensoriales. Un estudio similar realizado por Vidrih & Hribar (2007) evaluaron los componentes volátiles en hidromieles con tres variedades de miel (castaños, tilos y mielada), donde se encontraron más alcoholes superiores (*n*-propanol, iso-butanol, alcohol iso-amilo) y acetato de etilo en hidromiel de castaña en comparación con los otros dos tipos de miel.

Mendes- Ferreira *et al.* (2010) muestran en su investigación que la calidad sensorial del producto final se ve influenciado por el tipo de levadura y el tipo de miel. Teramoto *et al.* (2005) compararon el producto resultante de la fermentación de miel usando tres tipos de levadura, incluida una aislada de una bebida fermentada local, demostrando tras analizar sus componentes aromáticos por cromatografía de gases, que éstas eran relativamente similares entre sí; sin embargo, algunos compuestos fueron diferentes entre las tres muestras evaluadas.

Šmogrovičová *et al.* (2012), en su investigación respecto al perfil aromático de hidromieles procedentes de Eslovaquia y sur de África reporta las concentraciones de los principales compuestos volátiles encontrados tales como: ésteres sintetizados durante la fermentación como resultado de la actividad de la levadura que aporta varios aromas florales; el acetato de etilo, un compuesto responsable de un agradable aroma afrutado, predominando en el perfil volátil tanto en la hidromiel eslovaca como en lotes sudafricanos, con valores entre 16 y 60 mg/l. Igualmente se reporta una concentración de acetato de metilo entre 0,68 y 1,82 mg/L y de otros ésteres tales como acetato de isobutilo, acetato de amilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo, estos últimos no presentaron diferencias significativas entre el hidromiel eslovaco y los lotes de Sudáfrica; respecto a la concentración de polifenoles los valores reportados se encontraron entre 177,8 mg/l y 241,4 mg/l (equivalentes de ácido gálico).

1.5.9 Uso de células inmovilizadas en la producción de hidromiel

En la búsqueda de mejorar el proceso de elaboración de hidromiel, también se ha planteado el uso de células inmovilizadas, con el fin de evaluar su efecto en el producto obtenido. Navratil *et al.* (2001) reportan el uso gel de pectato de calcio con el cual obtuvo una tasa de producción de etanol de 5.7 g/L-h. Qureshi & Tamhane (1985) usando esferas de alginato de calcio reportan un mejoramiento en la producción de etanol pasando de 0,09 g/h a pH 4,5 usando células libres a 4,09 g/h a pH 5,5 con el uso de células inmovilizadas, trabajando estas últimas a una temperatura óptima de 35°C, estos mismos autores en el año 2007 lograron una concentración de etanol de 70 g/L y una productividad de 23.1 g/L-h bajo operación continua durante 110 días con la misma matriz de inmovilización.

Recientemente, Pereira *et al.* (2014) compararon la inmovilización de células de levadura sobre una sola capa de alginato de calcio y de doble capa de alginato - quitosano para la elaboración de hidromiel; no encontrándose diferencias entre ellas pero lográndose identificar una mayor concentración de compuestos indeseables en los productos de fermentación con células inmovilizadas en esta matriz. Otro estudio reportado por Sroka *et al.* (2013) reporta que la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* sobre bayas de uva aumenta la concentración de etanol en lotes jóvenes, y que la inmovilización de microorganismos por adhesión elimina el problema de la resistencia a la difusión, que se produce durante la inmovilización de microorganismos en geles.

Los estudios en Colombia respecto al uso de esta tecnología en elaboración de hidromiel son escasos solo reportándose el estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2014) donde en la producción de hidromiel con agraz no se reportaron diferencias en la producción de etanol respecto al uso de células libres.

2. Metodología

Este trabajo se desarrolló en la planta piloto de vegetales y en el laboratorio de control de calidad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

2.1 Materias primas

2.1.1 Miel y Mielato

Como materia prima se adquirió miel y mielato en apiarios del municipio de San Mateo, Boyacá. Antes de su uso en el proceso fermentativo, se realizaron pruebas para la determinación de su calidad fisicoquímica y se verificó el cumplimiento de la resolución Colombiana 1057 (Ministerio de la Protección Social 2010) y de la Norma Técnica Colombiana NTC 1273 (ICONTEC 2009). La miel fue almacenada en recipientes plásticos de primer uso en un lugar fresco, seco y protegido de la luz. Los métodos para los análisis realizados se explican a continuación:

Humedad: su determinación se realizó utilizando el método 969.38 de la AOAC (AOAC 2012), se utilizó un refractómetro de mesa tipo Abbé.

Azúcares reductores: para su determinación se utilizó el método 920.183 de la AOAC. (AOAC 2012).

Sacarosa aparente: se realizó según el método de la AOAC 920.184 (AOAC 2012).

pH y acidez libre: se disolvieron 10 g de miel en 75 ml de agua libre de dióxido de carbono en un vaso de precipitados de 250 ml, esta solución se tituló con NaOH 0.1 M a pH 8.30. Los resultados fueron expresados en meq/kg (Bogdanov 2009). Para la determinación del pH se sumergió el electrodo de un pH-metro (Mettler Toledo T70 suiza) en la solución y se registró su pH.

Hidroximetilfurfural (HMF): la determinación se realizó por absorbancia en el rango UV visible a una longitud de onda de 284 nm y 336 nm, para ello se utilizó un espectrofotómetro Jasco V530 usando como blanco una muestra con bisulfito de sodio al 0.2 % (Bogdanov 2009).

Índice de diastasa y solidos solubles: se realizaron según los métodos armonizados de la comisión internacional de miel (Bogdanov, 2009).

Recuento de mohos y levaduras: Se tomó una alícuota de 1 ml, de una serie de diluciones consecutivas realizadas previamente, las cuales se depositaron en cajas Petri estériles y se adicionaron 15 ml de agar OGY (oxitetraciclina glucosa extracto de levadura) manteniéndose a 45 °C durante un tiempo de 7 días. Se realizó el recuento de las UFC/g, teniendo en cuenta el factor de dilución (Holguin Hernandez *et al.* 1998).

2.1.2 Levadura

Se utilizó levadura *Saccharomyces cerevisiae* raza fisiológica *bayanus*, usada en procesos de fermentación para la obtención de bebidas alcohólicas tipo vino, distribuida por la casa comercial interenzimas de Colombia.

2.1.3 Carragenina

Se utilizó Kappa-carragenina distribuida por la empresa CIMPA S.A.S.

2.1.4 Alginato

Se utilizó alginato de sodio distribuido por la empresa Chemical LTDA.

2.2 Evaluación de soportes para la inmovilización de levadura.

2.2.1 Inmovilización de levadura en alginato de sodio

Para la formación de las esferas se preparó una solución de alginato de sodio al 3% m/v a la cual se le adicionó la suspensión de levaduras activada previamente en relación 1/1 consiguiendo una mezcla al 1,5% m/v de alginato de sodio. La activación de la levadura se realizó en el 5% del mosto a utilizar usando 0,5 g/l de levadura a una temperatura de 37°C durante 30 minutos.

La mezcla anteriormente descrita se hizo gotear con ayuda de una bomba peristáltica sobre una solución esterilizada de cloruro de calcio 0.05 M para obtener las esferas con las células inmovilizadas, las cuales se dejaron en refrigeración durante 24 horas con el fin de que adquirieran consistencia y mayor estabilidad. Posteriormente, las esferas se lavaron con agua destilada y se adicionaron a los ensayos correspondientes. El protocolo de inmovilización anteriormente mencionado se siguió según la metodología reportada por Davila *et al.* (2014).

2.2.2 Inmovilización de levadura en carragenina

Dado que al usar las concentraciones de carragenina y cloruro de potasio reportados en literatura no se lograron condiciones que permitan un buen proceso de formación de la esfera fue necesario realizar ajustes variando la concentración de carragenina y de cloruro de potasio. Se prepararon mezclas de carragenina–mosto de miel hasta alcanzar concentraciones de 2 y 3% de carragenina usándose para todos los casos una solución madre de carragenina al 4 % p/v. La mezcla se depositó en una jeringa de 50 mililitros y se hizo gotear sobre soluciones estériles de cloruro de potasio a diferentes concentraciones (2, 8, 12, 16 p/v) a 4 °C para inducir la formación del gel. Las esferas se dejaron en refrigeración durante 24 horas con el fin de que adquieran consistencia y mayor estabilidad. El método de inmovilización fue el reportado Rodriguez *et al* (2014).

El volumen de la mezcla de carragenina-mosto correspondió al 10 % del volumen final del mosto de fermentación. Se utilizó 0.5 g/L de levadura la cual se activó en el

porcentaje de mosto de la mezcla carragenina-mosto anteriormente descrita. La activación se realizó a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos.

Se realizó un análisis de dureza, adhesividad y elasticidad usando un texturometro TA-XT2 (Stable Micro Systems). Para este análisis solo se utilizaron las esferas con concentración de 3% de carragenina, debido a una alta fragilidad que presentaron las esferas con 2% de carragenina. 15 esferas fueron puestas en la base del texturometro (TA.XT plus, Texture Analyser) y fueron prensadas por una sonda cilíndrica de 31 mm a una velocidad de 0,5 mm/s siguiendo la metodología usada por Flores *et al* (2014) con algunas modificaciones.

Para evaluar el comportamiento de las esferas bajo las condiciones de proceso se realizó el procedimiento de inmovilización anteriormente descrito y se inoculó la levadura inmovilizada en el mosto a 25 y 30 °C. En esta etapa se determinó visualmente la estabilidad de las esferas en el medio de fermentación, definiendo este parámetro como la capacidad de las mismas para no alterar su forma durante el proceso. Para esta parte de la experimentación se realizó el procedimiento de inmovilización anteriormente descrito y se evaluó su comportamiento durante un periodo de 15 días.

Se escogieron los parámetros de dureza de la esfera y elasticidad, así como las condiciones de estabilidad en el mosto de fermentación para escoger la mejor concentración de la mezcla carragenina–mosto a utilizarse en las siguientes etapas de la investigación.

2.2.3 Caracterización de las esferas

Las esferas de alginato y carragenina fueron caracterizadas en cuanto a su tamaño y densidad. El tamaño se determinó mediante la medición de su diámetro con la ayuda de un calibrador, la densidad de las esferas se determinó midiendo el volumen de líquido desplazado por una masa conocida de estas y para el peso por esfera se utilizó una balanza analítica. En total se midieron 10 esferas por tratamiento y se registró el promedio de las medidas realizadas.

2.3 Comparación del proceso fermentativo de miel usando células libres e inmovilizadas.

2.3.1 Diseño experimental

Para la comparación del proceso de fermentación se aplicó un diseño factorial (3x2x2) evaluando el efecto del tipo de célula (células libres, células inmovilizadas en alginato y células inmovilizadas en carragenina, tipo de miel (miel floral y miel de mielato) y la temperatura de fermentación (25°C y 30°C). Los valores de temperatura fueron escogidos según lo reportado por otras investigaciones (Acosta 2012; Gomes *et al.* 2013; M Navrátil *et al.* 2001; Hernández 2015). Estas temperaturas son favorables a las condiciones ambientales presentes en el municipio de San Mateo Boyaca de donde proceden las mieles para esta investigación y donde se busca industrializar la producción de hidromiel.

Las variables dependientes (sólidos solubles, etanol, pH, acidez total, acidez volátil, glicerol) fueron evaluadas durante y/o posterior al proceso fermentativo.

2.3.2 Métodos analíticos y procedimientos para seguimiento de la fermentación

El seguimiento de la fermentación se realizó inicialmente por medición del consumo de sólidos solubles teniendo un estimado del fin del proceso cuando los valores permanecen constantes en el tiempo. Durante la fermentación se recolectaron muestras periódicas en frascos ambar de 25 ml para la determinación de acidez volátil y pH, azúcares y etanol. Las muestras fueron centrifugadas y congeladas a -30 °C para posteriores análisis.

Los procedimientos de los métodos anteriormente mencionados se enumeran a continuación:

Sólidos solubles: se realizó utilizando un refractómetro marca SinoTech Referencia SG-100/ATC. Los valores reportados fueron corregidos a una temperatura de 20°C.

pH: se determinó según el método 960.19 de la AOAC (AOAC 2012).

Acidez total: se tomaron 10 ml de hidromiel disuelta en agua destilada libre de CO₂ a 20 °C; se tituló con NaOH 0.1 N hasta pH 8.2 usando el método AOAC 945.08 (AOAC 2012). Los resultados se expresaron en gramos de ácido tartárico por litro. Si bien este ácido no es el predominante se usa en esta investigación para comparar los resultados con la Norma Técnica Colombiana para vino de mesa usada en Colombia, así como para realizar un comparación con los resultados en investigaciones con hidromiel donde su valor es reportado de esta manera.

Acidez volátil: su determinación se realizó por la destilación de 110 ml de hidromiel y la titulación con hidróxido de sodio 0.1 N siguiendo la metodología de la NTC 5114 con modificaciones en el volumen de muestra (ICONTEC 2003). La acidez volátil del hidromiel se expresó en gramos de ácido acético por litro.

Azúcares, etanol y glicerol: la determinación se realizó usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) según norma AOAC 977.20 con algunas modificaciones, para ello se utilizó un equipo de cromatografía marca JASCO 2000 y una columna Sugar-Pak I (300 x 6.5 mm de diámetro interno, marca Waters) usando como fase móvil agua desionizada y desgasificada y un detector de índice de refracción (IR). Las condiciones de operación fueron: flujo de fase móvil: 0,5 ml/min; temperatura del horno: 80°C; temperatura del detector: 40°C y volumen de inyección de muestra: 20µL, los resultados fueron expresados en % p/v. (AOAC 2012)

.Rendimiento y productividad: para el cálculo de rendimiento en el proceso se tuvo en cuenta la relación entre la cantidad de etanol producido y el sustrato consumido. La cantidad de azúcares consumidos se obtuvo midiendo la concentración de azúcares de las muestras iniciales y finales. El rendimiento en la producción de etanol se basó en la según la relación estequiometria:



La productividad se evaluó según la cantidad de etanol producida por unidad de volumen de hidromiel y por unidad de tiempo. El cálculo se realizó a partir de la concentración de alcohol del hidromiel y la densidad del etanol a 20°C (789 g/L), además del tiempo consumido por el proceso de fermentación.

2.3.3 Procedimientos para la elaboración de hidromiel

Preparación del mosto de fermentación

La miel o el mielato fueron diluidos en agua hasta una concentración de 24° Brix (Hernández 2015); posteriormente se agregó polen como fuente de nitrógeno en una relación de 4g/L (Blanco & Cuenca 2014). Esta mezcla fue sometida a un proceso de pasteurización a 65°C durante 20 minutos y a un proceso de enfriamiento rápido para lograr la disminución de la flora natural presente en la mezcla. Todos los recipientes y utensilios utilizados fueron previamente esterilizados.

Activación de la levadura de trabajo

Se realizó según las recomendaciones establecidas por la casa matriz. Para la fermentación con células libres se utilizó un 10 % del mosto total y se adicionó la levadura en una relación de 0,5 g/L de mosto manteniendo una temperatura de 35 °C durante 30 minutos (Blanco *et al.* 2012). La activación de la levadura para el proceso de inmovilización en alginato y carragenina se realizó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura usadas en células libres. El porcentaje de mosto en que se activó la levadura se manejó según lo reportado en la metodología de inmovilización.

Inoculación del mosto y etapa de fermentación

El mosto previamente pasteurizado fue depositado en frascos de vidrio estériles provistos de tapas con adaptaciones de mangueras de silicona, una de las cuales permitía la salida de CO₂ del sistema a través de un filtro de 0,45 mm dispuesto en la terminación de la misma y la otra permitía la recolección de las muestras necesarias. Los frascos fueron guardados en refrigeración a la espera de su inoculación con células libres o inmovilizadas (Acosta 2012). El proceso de inoculación se realizó en un ambiente estéril depositando la levadura previamente activada en la totalidad del mosto.

Finalización de la fermentación

Terminado el proceso de fermentación, el producto obtenido fue trasegado con el fin de separar los sedimentos presentes y pasterizado a 65 ° C durante 20 min. El proceso de clarificación se realizó en la botella donde fue trasegado aplicando 3 g/l de bentonita, dejándose en reposo durante 7 días. Posteriormente el líquido fue nuevamente trasegado para retirar la bentonita para su posterior almacenamiento.

2.3.4 Evaluación sensorial

Se realizó un análisis sensorial de los hidromieles obtenidos mediante una cata descriptiva. Se pidió a 8 panelistas entrenados que evaluaran los siguientes descriptores que representan las principales características organolépticas en una bebida alcohólica tipo vino (Alonso *et al.* 2007):

Evaluación visual: limpidez, matiz o tono, intensidad de color, lágrimas o piernas y fluidez.

Evaluación olfativa: intensidad de olor, intensidad de aroma, defectos de olor y aroma, persistencia global.

Intensidad gustativa: intensidad del sabor dulce, salado, amargo y alcohol, astringencia, presencia de aristas, cuerpo y equilibrio. El parámetro cuerpo y equilibrio hace referencia a una evaluación global que el panelista realiza al producto en los parámetros gustativos. El formato de evaluación utilizado se puede observar en el anexo A.

2.3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de un factor se utilizó un ANOVA simple y en los casos donde intervienen más de un factor se utilizó ANOVA multifactorial con un nivel de confianza del 95 %. El análisis de medias se realizó utilizando el procedimiento de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher. El análisis estadístico para las pruebas sensoriales se realizó usando Kruskal Wallis (prueba no paramétrica). Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes unas de otras se analizaron las muesca de mediana de las gráficas correspondientes a cajas y bigotes.

Se realizó un análisis de componentes principales con el fin de relacionar las variables estudiadas así como de observar agrupamiento entre clases.

En la sección de anexos se encuentra relacionados los soportes del análisis estadístico. Estos análisis se realizaron con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI (16.1.03)

2.4 Reutilización de células en nuevas fermentaciones

Terminada la primera fermentación, el producto obtenido fue trasegado y las células inmovilizadas fueron lavadas con agua destilada y reutilizadas en nuevas fermentaciones realizándose en cada una de ellas seguimiento de los parámetros de rendimiento y productividad (Kourkoutas *et al.* 2003; Puig *et al.* 2010). Los procedimientos, condiciones de fermentación y métodos de análisis para su seguimiento fueron los mismos usados previamente en esta investigación.

Para la reutilización de las esferas en nuevas fermentaciones, se determinó primero la densidad celular al final del proceso de la primera fermentación colocando una esfera en un tubo de microcentrífuga que contenía 1,5 ml de buffer citrato 0,1 M a pH 4,8 y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para solubilizar la matriz. Esta mezcla se agitó vigorosamente hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer. (Jiménez *et al.* 2011). Para el conteo celular se mezcló un mililitro de la matriz solubilizada con un mililitro de azul de metileno. El uso de azul de metileno colorea la pared celular de las células muertas lo que permite calcular la viabilidad de la levadura presente (Vairo 1961).

Se aplicó un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95 % para evaluar diferencias entre los tratamientos. El análisis de medias se realizó utilizando el procedimiento de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher.

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de materia prima

A continuación se presenta una caracterización fisicoquímica de la miel y el mielato que fueron empleados como materia prima.

3.1.1 Análisis fisicoquímico

Las mieles evaluadas cumplieron con lo establecido en la norma NTC 1273 y la resolución 1057 de 2010. Las mieles de mielato presentaron un contenido de humedad superior a la miel floral al igual que una mayor acidez libre así como una menor concentración de azúcares reductores. En la tabla 3-1, se registran los resultados fisicoquímicos obtenidos para las mieles utilizadas.

Tabla 3-1: Análisis fisicoquímico para miel floral y miel de mielato.

Análisis	Miel	Mielato	Valor de referencia (Ministerio de la Protección Social 2010)
Contenido de humedad % m/m	17.7	20.9	≤ 20 para mieles de origen tropical
Azúcares reductores % m/m	76.9	66.4	≥ 45 (miel de mielato) ≥ 60 (miel floral)
Sacarosa aparente % m/m	4.1	7.1	≤ 10 para mieles de origen tropical
Acidez libre meq /1000 g	31.3	45.2	≤ 50
Contenido de hidroximetilfurfural (mg/kg)	5.6	4.7	≤ 40 ≤ 60 para mieles de origen tropical

Índice de diastasa (Escala shade)	25.7	25	≥ 8
Sólidos insolubles en agua (% m/m)	0.08	0.06	≤ 0.1 para miel diferente a la prensada ≤ 0.5 para miel prensada

3.1.2 Análisis microbiológicos

La materia prima (miel y mielato) cumplió con los parámetros microbiológicos de calidad establecidos por la norma NTC 1273 y la resolución 1057 de 2010. Los resultados se encuentran en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Análisis microbiológico de miel floral y miel mielato.

yyAnálisis	Resultado miel floral	Resultado miel mielato	Valor de referencia (Ministerio de la Protección Social 2010)
Recuento de mohos y levaduras ufc/g o ml	Menor a 10	Menor a 100	10 -100
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor ufc/g o ml	Menor a 10	Menor a 10	10-100

3.2 Evaluación de soportes para inmovilización

3.2.1 Selección de condiciones de inmovilización en esferas de carragenina

En la tabla 3-3 se muestran los resultados obtenidos en análisis de dureza, adhesividad y elasticidad realizada para las esferas con 3% p/v de carragenina; esta medición no se realizó para las esferas fabricadas con 2% p/v de carragenina debido a la fragilidad mostrada durante su manipulación lo cual impedía su medición. Se presentaron diferencias significativas para las variables de dureza, ($p < 0.05$), con un aumento en este parámetro a mayor concentración de solución de cloruro de potasio que favorece su

estabilidad evitando su deformación y posibilitando una mayor retención de la levadura en el interior del gel. Una mayor concentración de iones de potasio aumenta el número de redes moleculares en el gel formado. Las concentraciones de sal de potasio utilizadas en este estudio fueron mayores que las reportadas en otras investigaciones: 2.2 % p/v (King & R. Zall 1983) y 5.2 % p/v (Sankalia *et al.* 2006) lo cual podría atribuirse a que el tipo de carragenina utilizada no presenta la calidad esperada requiriéndose una mayor concentración de iones de potasio para lograr la formación del gel. Las esferas formadas a partir de las mezclas que contenían 2 y 3 % de solución de carragenina presentaron formas irregulares cuando se pusieron en contacto con la solución de cloruro de potasio al 2 % p/v. Para el resto de soluciones de cloruro de potasio utilizadas estas presentaron formas más uniformes; sin embargo, en ninguno de los casos fueron totalmente esféricas.

Tabla 3-3: Resultados de TPA en esferas de carragenina al 3% p/v con diferentes soluciones de cloruro de potasio (8, 12 y 16 %).

KCl (%p/v)	Dureza g-f)	Adhesividad (g/s)	Elasticidad
16	351±13.9 ^a	-11.4±1.1 ^a	0.89±0.02 ^a
12	310±1.3 ^b	-10.9±2.6 ^a	0.86±0.03 ^a
8	265±6.1 ^c	-14.6±1.9 ^a	0.84±0.02 ^a

Letras distintas en la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El análisis visual realizado a la estabilidad de las esferas en el medio de fermentación durante un periodo de 15 días mostró que a mayor concentración de la sal de potasio y carragenina, la esfera formada presentaba mejores características de forma y resistencia a la deformación. Los resultados de este análisis pueden observarse en la tabla 3-4 donde a una concentración de carragenina al 3 % p/v y de sal de cloruro de potasio al 16 % p/v las esferas formadas presentan una mejor estabilidad, este resultado es ocasionado por un mayor número de interacciones entre la carragenina y la sal de potasio utilizada. Se observó un incremento de su tamaño pasadas 24 horas de contacto con el medio, lo cual se atribuye el hinchamiento presentado debido a la emisión de CO₂ generado en la esfera o a la capacidad del gel de hidratarse con el agua contenida en el medio. La mayoría de las esferas formadas a partir de solución de 2 % p/v de carragenina se deformaron a las pocas horas de estar en contacto con el medio.

Tabla 3-4: Efecto del medio de fermentación en la estabilidad de las esferas

KCl	% Carragenina (25 ° C)			% Carragenina (30 ° C)		
	2%	8%	16%	2%	8%	16%
2%	baja	baja	Media	baja	Baja	Media
3%	baja	Baja	Media- Alta	baja	Baja	Media Alta

King (2003) señala que en los procesos de inmovilización las altas concentraciones de CO₂ generadas dentro de las esferas producto del proceso de fermentación pueden ocasionar cambios en la rigidez de la esfera causando su deformación (King, 1983). El proceso de deformación también puede ser ocasionado por efecto del pH del medio al realizarse una hidrólisis de los enlaces glucosídicos (Necas & Bartosikova 2013).

Imeson (1997) reporta que factores como bajo pH (≤ 3.5) en presencia de temperatura puede ocasionar la inestabilidad del gel, razón por la cual algunas esferas se destruyen durante la fermentación o pierden la forma geométrica inicial). La disminución del pH a lo largo del proceso de fermentación causa que las esferas, estables al inicio de la fermentación sean frágiles con el tiempo y se destruyan con facilidad.

Se escogió la concentración de 3% de carragenina y 16% de cloruro de potasio para continuar con el proceso de fermentación por presentar las mejores características en los parámetros de forma, estabilidad en el medio de fermentación y mayor grado de dureza.

3.2.2 Caracterización de esferas de alginato y carragenina

En la tabla 3-5, se describen las características de las esferas estudiadas para los parámetros de densidad, diámetro y peso unitario por esfera, igualmente en la tabla 3-5 se reportan los resultados obtenidos del conteo celular realizado en cámara de Neubauer y el porcentaje de viabilidad encontrada al finalizar la primera fermentación. En todos los experimentos (células libres e inmovilizadas) se utilizó una cantidad de levadura inicial de 0.5 g/l de levadura con una concentración promedio de 3.5×10^6 ufc.

Tabla 3-5: Caracterización de las esferas de alginato y carragenina usadas para la inmovilización.

Inmovilizante	Densidad (g/l)	Diámetro (mm)	Peso (g)
Carragenina	1.055 ± 0.320	3.9 ± 0.1	0.07±0.00
Alginato	1.14 ± 0.10	2.3 ± 0.2	0.05 ± 0.01

Tabla 3-6: Conteo de células de levadura inmovilizadas en diferentes matrices.

Matriz de inmovilización	Recuento (ufc/ml)	Viabilidad (%)
Miel carragenina 25 °C	1.24×10^7	95
Miel carragenina 30 °C	1.32×10^7	93
Miel alginato 30 °C	1.36×10^7	91
Miel alginato 25 °C	2.89×10^7	97
Mielato carragenina 25 °C	1.94×10^7	94
Mielato carragenina 30 °C	1.71×10^7	96
Mielato alginato 25°C	2.10×10^7	93
Mielato alginato 30 °C	1.45×10^7	91

El recuento de células de levadura inmovilizada en esferas de alginato y carragenina se encontró dentro de los valores reportados por otros investigadores como adecuados para el proceso de fermentación, los cuales se encontraban entre 10^5 y 10^8 UFC/ml (Gomes *et al.* 2010; Mendes-Ferreira *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2009).

El análisis estadístico mostró que el tipo de célula y temperatura influyen en el recuento de unidades formadoras de colonia encontradas al final de la primera fermentación; presentando un valor mayor en las esferas inmovilizadas con alginato y a una temperatura de 25°C. También se observó una interacción entre el tipo de miel y el tipo de célula presentándose valores más altos usando miel floral y células inmovilizadas en alginato.

Para el caso de la viabilidad no se encontraron diferencias entre los experimentos evaluados, con valores superiores al 90 % de células viables.

3.3 Seguimiento del proceso fermentativo

3.3.1 Comportamiento de los sólidos solubles

Dado que en el mosto de fermentación la mayor parte de los sólidos solubles corresponden a los azúcares presentes en la miel, el seguimiento de los grados brix en el tiempo permite evaluar el proceso de fermentación y establecer el momento en el que este se detiene. Este parámetro ha sido usado frecuentemente en el seguimiento de fermentación alcohólica de miel en numerosas investigaciones (Acosta 2012; Hernández 2015; Blanco *et al.* 2014; Davila *et al.* 2014) así como también ha sido utilizado

eficientemente para determinar el fin del proceso en la fermentación de vino de frutas (Oliveira *et al.* 2011).

Las figuras 3-1 y 3-2 representan el consumo de los sólidos solubles durante el proceso de fermentación a partir de miel y de mielato. Se observa un comportamiento típico caracterizado por una disminución drástica en los primeros días de fermentación, seguido de una reducción en la velocidad de consumo para terminar con un periodo donde existe una mínima disminución con una tendencia a mantener un valor constante. El tiempo en el cual se presenta un valor estable en el parámetro de sólidos solubles se estableció como final del proceso de fermentación.

El análisis estadístico presentado en el anexo B muestra que el tipo de miel, tipo de célula (libre o inmovilizada) y la temperatura así como las interacciones entre estos tres factores influyen en el valor final para sólidos solubles ($p < 0.05$). Respecto al tipo de miel, la miel floral registró una disminución hasta estabilizarse en un valor medio de 9.7 grados Brix en comparación con la miel de mielato donde el valor se detuvo en 11.8 grados Brix; evidenciándose una mayor dificultad para la levadura al metabolizar los azúcares de la miel de mielato. Respecto a la forma en que se encuentra la levadura (libre o inmovilizada) el mayor consumo de azúcares se dio en la fermentación con levadura inmovilizada en alginato, seguido de carragenina y finalmente con el uso de células libres con valores promedio de 9.65, 10.33 y 11.97 ° Brix respectivamente pudiéndose entender que el microambiente generado en la inmovilización permite a las levaduras un mayor consumo de azúcares del medio.

El análisis de interacciones muestra que se logra una mayor disminución de sólidos solubles cuando se usa miel floral en combinación con células de levadura inmovilizadas en alginato, seguido de las células inmovilizadas en carragenina y células libres.

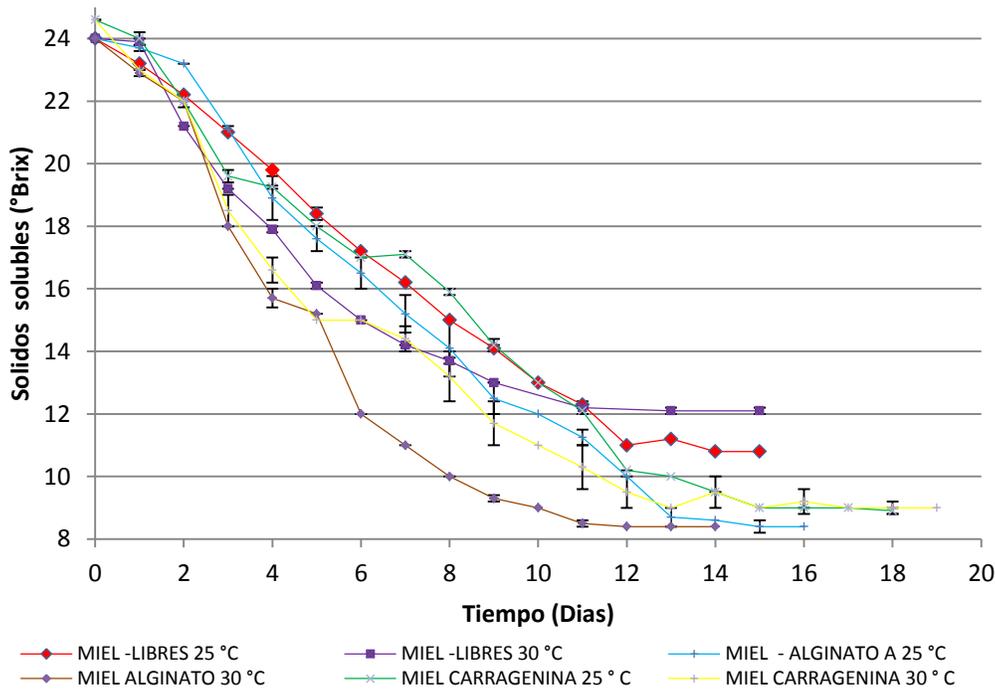
Para un análisis estadístico de la fermentación únicamente con miel floral existen diferencias significativas en la concentración final de sólidos solubles (°Brix) según el tipo de célula utilizado ($p < 0.05$) y no según la temperatura. Respecto al tipo de célula utilizada la fermentación con células inmovilizadas en alginato presentó los valores más bajos respecto a la disminución de sólidos solubles (8.6 Brix) en comparación con las células libres e inmovilizadas en carragenina (11.65 y 9 °brix respectivamente). El análisis de interacción entre la condición en que se encuentra la célula y temperatura

muestra que cuando se usan células inmovilizadas en alginato y una temperatura de 30 °C se percibió la mayor disminución de sólidos solubles.

El tiempo de finalización de la fermentación por su parte presenta diferencias respecto a la forma en que se encuentre la célula (libre o inmovilizada) y no respecto a la temperatura manejada. Respecto al tipo de célula utilizada la fermentación con esferas de carragenina presentó los tiempos más altos (17 días) en el proceso de fermentación en comparación con la realizada con células libres o células inmovilizadas en alginato (12.5 días) sin que existiera un mayor consumo de azúcares.

La interacción usando células inmovilizadas en alginato o células libres con una temperatura de 30 °C presentó los mejores resultados con un menor tiempo en el proceso de fermentación.

Figura 3-1: Disminución de sólidos solubles en la fermentación de miel usando células libres e inmovilizadas en alginato y carragenina.

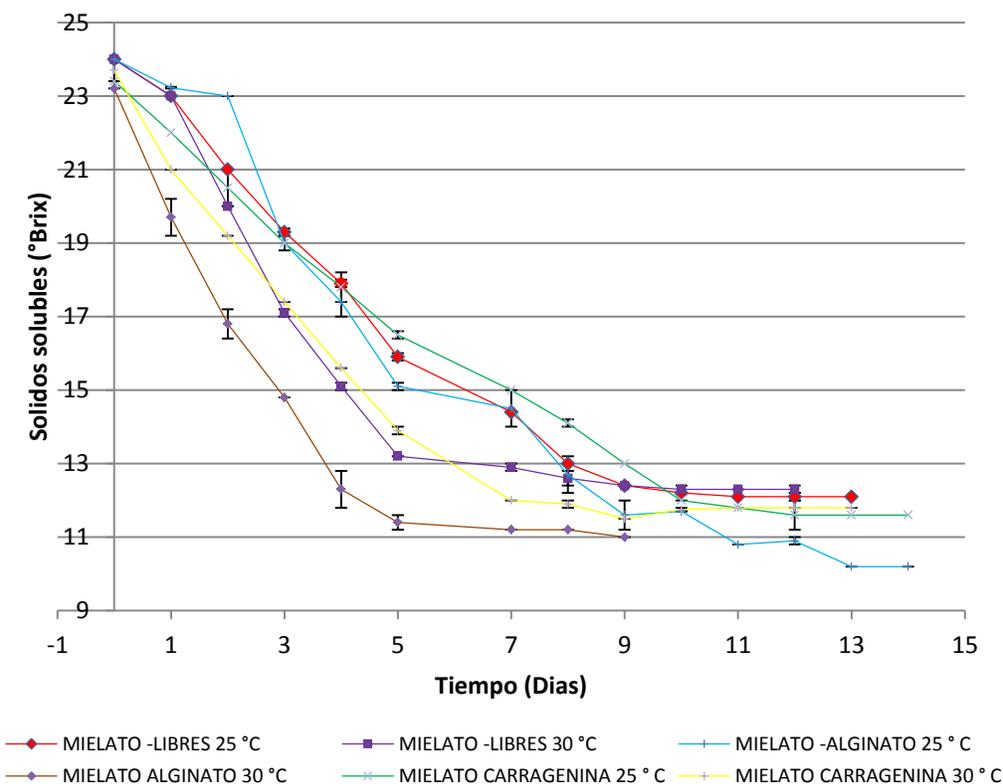


La figura 3-2, muestra la disminución de la concentración de sólidos solubles (°Brix) en la fermentación con mielato. El análisis estadístico mostró diferencias significativas respecto a la condición en la que se encuentra la levadura (libre o inmovilizada) y respecto a la temperatura ($p < 0.05$). Según la forma en que se encuentra la célula se

observaron diferencias significativas entre las tres condiciones manejadas, observándose una mayor disminución de sólidos solubles en las fermentaciones con esferas de alginato (10.7 Brix) en relación a la realizada con esferas de carragenina (11.6 Brix) y células libres (12.3 Brix) condición similar a la encontrada en la fermentación con miel floral. Para el caso de la temperatura cuando se trabaja a 25 °C se presenta una mayor disminución (11.33 Brix) respecto a la temperatura de 30 °C (11.78 Brix).

Respecto al tiempo final de fermentación, este se vio afectado según la forma en que se encontraba la célula (libre o inmobilizada) y respecto a la temperatura. El tiempo más alto se registró para la fermentación con células en carragenina (10.5 días), seguido de la fermentación con levadura inmobilizada en alginato (9.75 días) e inmobilizadas en células libres (8.5). Según la temperatura manejada un tiempo más largo de fermentación (10.66 días) se alcanzó con la temperatura más baja evaluada (25°C).

Figura 3-2: Contenido de sólidos solubles durante la fermentación de mielato usando células libres e inmobilizadas en alginato y carragenina.



Los valores para sólidos solubles alcanzados al final de la fermentación usando miel floral fueron similares a los reportados en otras investigaciones (Davila *et al.* 2014; Acosta 2012); en fermentaciones con miel de mielato se reportan tiempos similares a los aquí reportados (Kempka & Mantovani 2013). Un mayor consumo de azúcares usando células inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en cascara de naranja respecto a células libres fue reportado por Plessas *et al.* (2007), para este caso los tiempos de fermentación fueron mayores en células libres que en inmovilizadas caso contrario a lo ocurrido en esta investigación donde el tiempo establecido como final de la fermentación fue menor en células libres.

Un detenimiento más rápido en el proceso de fermentación con mielato puede deberse a una acidez libre más alta en relación a la miel floral y también a una mayor capacidad antimicrobiana que pueda afectar el crecimiento o metabolismo de la levadura (Simova *et al.* 2012; Escuredo *et al.* 2013). Características tales como alta concentración de azúcares superiores y materiales indeterminados, también puede contribuir a este fenómeno (Fattori 2004).

3.3.2 Evaluación de acidez total

Las figuras 3-3 y 3-4 presentan los valores de acidez total en el tiempo, a lo largo del proceso de elaboración de hidromiel con miel floral y miel de mielato. Se evidencia que esta característica, se encuentra dentro de los límites establecidos por la norma para vinos tipo mesa según la NTC 708, con excepción de las fermentaciones usando miel floral y células inmovilizadas en carragenina a 25°C y miel de mielato con células inmovilizadas en carragenina a 30 °C donde el valor se encontró por debajo del límite inferior permitido.

Figura 3-3: Resultados de acidez total (g/L de ácido tartárico) para fermentación con miel usando células libres e inmovilizadas.

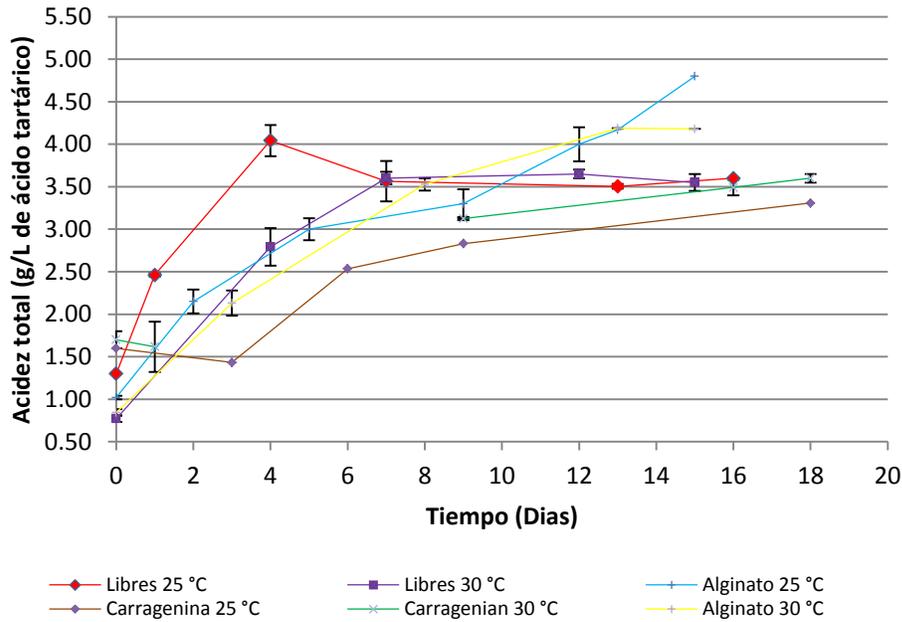
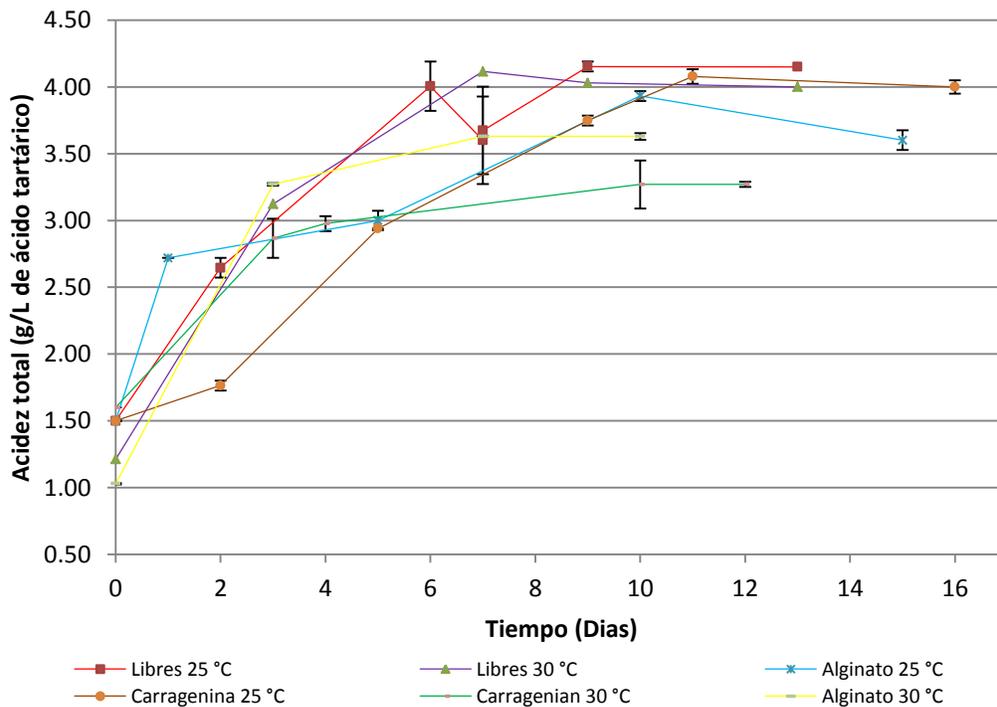


Figura 3-4: Resultados de acidez total (g/L de ácido tartárico) para fermentación con mielato usando células libres e inmovilizadas



Sroka & Tuszyński, (2007) muestran en su investigación que el aumento en la acidez es causada por un incremento en el ácido acético y el ácido succínico que son sintetizados por la levadura. El resto de ácidos que contribuyen a la acidez total provienen principalmente del mosto de fermentación.

El análisis estadístico presente en el anexo C, muestra que el valor final de la acidez total no está influenciado por el tipo de miel manejado o la temperatura pero si según la forma en que se encuentra la levadura (libre o inmovilizada), presentándose una menor concentración en las fermentaciones donde se utilizan células inmovilizadas en carragenina ($p < 0.05$). Igualmente se presentan interacciones entre los factores estudiados encontrándose que la fermentación donde se usó células inmovilizadas en alginato y miel floral, se presentó la mayor acidez en el producto final; por el contrario este valor fue menor para la combinación entre las células inmovilizadas en carragenina y este mismo tipo de miel. Para la interacción tipo de miel- temperatura se encontró una menor acidez usando miel floral a 25 °C en cambio la mayor acidez se dio usando miel de mielato a esta misma temperatura.

Un análisis por separado para cada tipo de miel, indica que en la fermentación de miel floral tanto el tipo de célula como la temperatura presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) para el parámetro estudiado. Según el tipo de célula existe un valor mayor, al usar células inmovilizadas en alginato (4.18 g/L de ácido tartárico) con relación a los resultados para la fermentación con células en carragenina (3.45 g/L de ácido tartárico) o libres (3.58 g/L de ácido tartárico).

En la fermentación con miel de mielato existieron diferencias según el tipo de célula utilizado, siendo esta significativamente mayor en la fermentación con células libres (4.13 g/L de ácido tartárico) en comparación con el valor final obtenido para fermentación con células inmovilizadas en alginato (3.61 g/L de ácido tartárico) y carragenina (3.67 g/L de ácido tartárico). El tipo de temperatura o la interacción entre los dos factores evaluados no presentaron diferencias para el parámetro estudiado.

El comportamiento tan variable que se da entre los experimentos puede explicarse por la generación de distintos microambientes según la condición en que se encuentra la célula, afectando el comportamiento fisiológico de la misma por el grado de estrés al que se encuentra sometida con lo cual se ocasiona la menor o mayor generación de ciertos compuestos responsables de la acidez.

Los valores de acidez para los hidromieles a partir de miel floral y miel de mielato fueron similares a los reportados en otras investigaciones (Acosta 2012; Mendes-Ferreira *et al.* 2010; Roldán *et al.* 2011; Šmogrovičová *et al.* 2012). En estudios de fermentación de miel con células inmovilizadas no se registró diferencias respecto a células libres para este parámetro (Pereira *et al.* 2014). Para el proceso de producción de vino de uva si se reporta un menor valor al usarse células inmovilizadas en alginato de calcio (Oliveira *et al.* 2011).

3.3.3 Seguimiento de pH

Las gráficas 3-5 y 3-6 representan los valores de pH a lo largo del proceso fermentativo. La evaluación del pH muestra una disminución de este parámetro a lo largo del tiempo, lo cual concuerda con el incremento en la acidez total mostrado anteriormente. El análisis estadístico (anexo D), indica que los tres factores evaluados (tipo de miel, temperatura y forma en que se encuentra la célula) así como la interacción entre factores influyen en el valor de pH ($p < 0.05$).

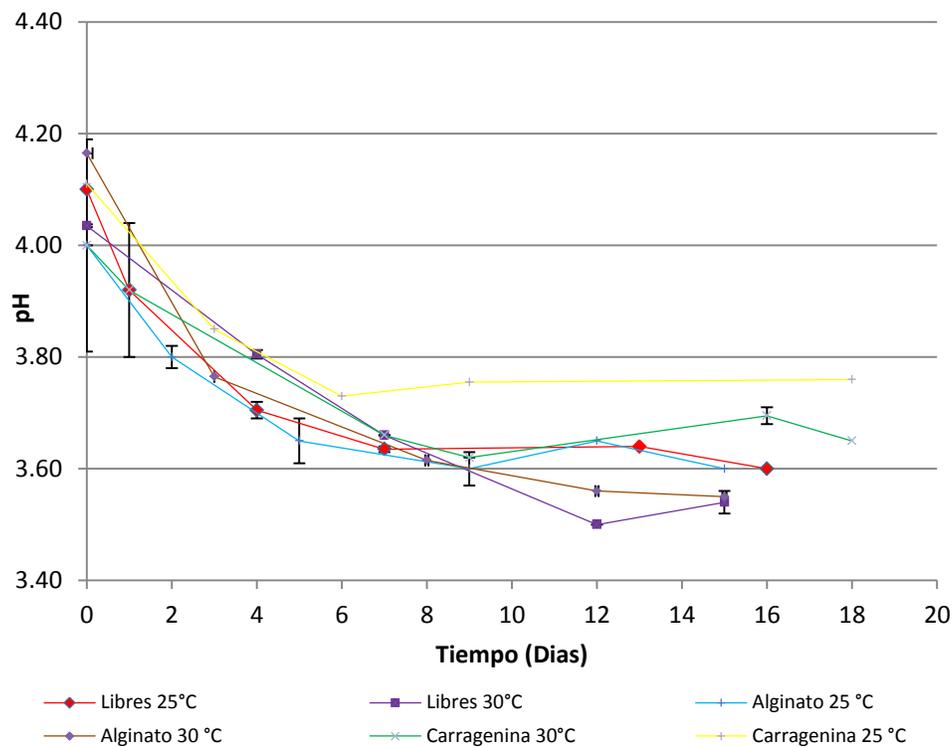
Según el tipo de miel los valores más altos para este parámetro se encuentran usando miel de mielato (pH 3.89) en comparación con miel floral (pH 3.62) lo cual concuerda con los resultados encontrados para el parámetro acidez total. Respecto a la forma en que se encuentra la célula, el pH fue mayor con células inmovilizadas en carragenina (valor promedio 3.82) en comparación con la fermentación con células libres (3.75) o inmovilizadas en alginato (3.7). Una menor temperatura también registro un mayor valor de pH para los experimentos realizados.

Respecto a las interacciones se encontró que al usar miel de mielato con células inmovilizadas en carragenina se alcanzaron los mayores valores en la variable pH, por el contrario los menores valores se registran para la combinación de miel floral con levadura inmovilizada en alginato. Para la interacción tipo de miel y temperatura el mayor valor de pH se alcanza con miel de mielato y temperatura de 25 °C. Para la

interacción tipo de célula y temperatura el mayor valor de pH se reporta usando células inmovilizadas en carragenina y una temperatura de 30 °C.

El análisis estadístico para cada tipo de miel muestra que en el caso de la miel floral el tipo de célula y la temperatura influyen en el valor final de pH. Los mayores valores en el pH final de la fermentación se dieron en el proceso con células inmovilizadas en carragenina y en el que se manejó una temperatura de 25°C.

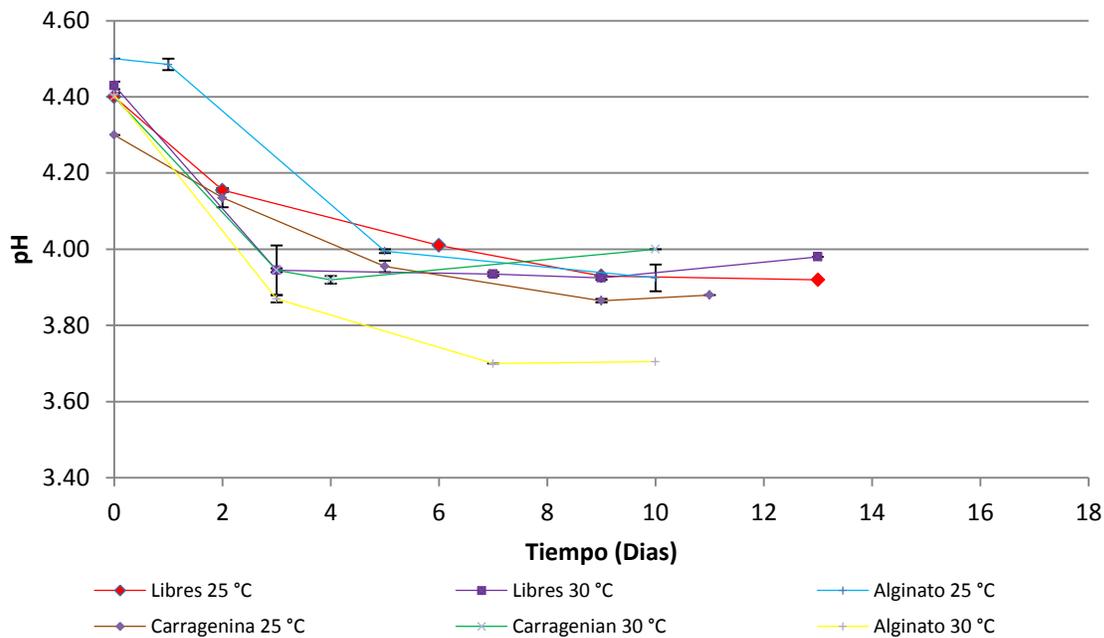
Figura 3-5: Resultados de pH para fermentación con miel usando células libres e inmovilizadas.



Para el caso de la fermentación con miel de mielato el análisis estadístico indica que el producto donde se utilizaron células inmovilizadas en alginato presentó el menor valor de pH (3.81) y para el caso de las interacciones entre los parámetros estudiados el mayor valor de pH se alcanzó usando células inmovilizadas en carragenina y una temperatura de 30 °C.

Sroka & Tuszyński (2007) manifiestan que el descenso en el nivel de pH durante la fermentación es causado principalmente por la síntesis de ácidos tales como acético y succínico.

Figura 3-6: Resultados de pH para mielato.



La variación en el pH entre el inicio y el final de la fermentación fue más notoria en la fermentación con miel floral en comparación con la miel de mielato. Los valores reportados para hidromiel en este parámetro son muy variables en las investigaciones realizadas (Gomes et al. 2013; Mendes-Ferreira et al. 2010; Pereira et al. 2014; Caridi et al. 1999). Un menor pH a lo largo de fermentación es benéfico para el hidromiel ya que evita el desarrollo de una microflora contaminante pero puede ser el causante de detener la fermentación antes del consumo total de los azúcares (Sroka & Tuszyński 2007). En esta, al igual que en otras investigaciones, se observa que el valor de pH decrece drásticamente en la primera semana y luego se mantiene constante hasta el final de la fermentación. Los valores de pH tienden a ser más estables y cercanos a un valor óptimo para la levadura (pH 4) en la fermentación con miel de mielato; en todos los casos se puede observar como los distintos ambientes en que se encuentra la levadura influye en el comportamiento que presenta el pH en el tiempo. En la mayoría de los casos las

fermentaciones con células inmovilizadas en carragenina tienden a estar más cercanas a un pH óptimo.

3.3.4 Determinación de acidez volátil

Las concentraciones de ácido acético en todas las muestras evaluadas se encontraron dentro de los límites establecidos por la normatividad nacional para vinos de mesa según la Norma técnica Colombiana NTC 708. Los resultados para este parámetro están registrados en las tablas 3-7 y 3-8. El análisis estadístico mostrado en el anexo E, indica que de los tres factores evaluados solo el tipo de miel presenta diferencias significativas respecto al valor final ($p < 0.05$), siendo este mayor para fermentación con miel de mielato (0.39 g/L de ácido acético) en comparación con miel floral (0.22 g/L de ácido acético).

La interacción presente entre el tipo de miel y el tipo de célula utilizado muestra una menor acidez volátil usando miel floral y células libres, en cambio usando el mismo tipo de célula pero con miel de mielato se presenta la más alta concentración de ácido acético en el producto final. Lo anterior es causado por la diferencia existente respecto a los compuestos ácidos presentes en los dos tipos de miel utilizados, siendo estos mayores en la miel de mielato.

Tabla 3-7: Determinación de acidez volátil (g/L de ácido acético) para hidromiel a partir de miel.

Células Libres		Células inmovilizadas			
		Alginato		Carragenina	
25°C	30 °C	25 °C	30 °C	25 °C	30°C
0.17 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.01

Tabla 3-8: Determinación de acidez volátil (g/L de ácido acético) para hidromiel a partir de mielato.

Células Libres		Células inmovilizadas			
		Alginato		Carragenina	
25°C	30 °C	25 °C	30 °C	25 °C	30°C
0.48 ± 0.00	0.45 ± 0.02	0.36 ± 0.09	0.39 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.03

Un análisis por separado para cada tipo de miel muestra que en el caso de la miel floral ninguno de los factores evaluados afecta significativamente el valor de la acidez volátil; sin embargo cuando se trabaja con miel de mielato el valor se ve afectado según la forma como se encuentra la célula (libre o inmovilizada) siendo este mayor en células libres (0.46 g/L de ácido acético) en comparación cuando se utilizó células inmovilizadas en carragenina.

3.3.5 Evaluación de la concentración de etanol

En las figuras 3.7 y 3.8 se reportan las diferentes concentraciones de etanol obtenidas en los experimentos realizados con miel floral y miel de mielato. El análisis estadístico (Anexo F) mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables: tipo de miel y tipo de célula así como entre las interacciones tipo de miel- tipo de célula y tipo de célula - temperatura. Para el tipo de miel se encontró una mayor concentración de etanol en fermentación con miel floral en relación con miel de mielato (12.14% v/v vs 10.9% v/v respectivamente). Igualmente según el tipo de célula utilizada la fermentación con células inmovilizadas en alginato presentó el valor más alto para etanol (12.26 % v/v) siendo este significativamente mayor respecto al valor promedio reportado con los otros dos tipos de célula. La temperatura no representó diferencias entre los tratamientos. Para la interacción tipo de miel-tipo de célula el mayor valor en etanol se da de la interacción usando miel floral y células inmovilizadas en alginato y para la interacción tipo de célula - temperatura entre miel floral y 30 °C.

Los factores estudiados (tipo de célula y temperatura) también fueron analizados por separado para cada tipo de miel. La fermentación con miel floral presentó diferencias significativas según la forma en que se encontraba la levadura siendo el valor para la variable respuesta etanol mayor ($p < 0.05$) usando células inmovilizadas en alginato (13.2 % v/v) e inmovilizadas en carragenina (12.67% v/v) en comparación con células libres donde la concentración promedio de etanol fue 10.55 % v/v. Según la temperatura manejada no se encontraron diferencias entre los tratamientos ni entre las interacciones entre los factores estudiados. Igualmente en la fermentación con miel de mielato se encontraron diferencias en la concentración final de etanol respecto a la forma en que se encontraba la levadura mas no respecto a las dos temperaturas manejadas; se encontraron valores significativamente más bajos en la fermentación usando células inmovilizadas en carragenina (10.06 %v/v) en comparación con las otras dos formas

utilizadas (11.33 v/v para células inmovilizadas en alginato y para la fermentación con células libres). La temperatura manejada no fue influyente en esta característica al evaluarse como factor independiente; sin embargo la interacción entre estas dos variables (forma en que se encuentra la levadura y la temperatura) muestra una mayor concentración de etanol usando células libres a una temperatura de 30°C en cambio la concentración más baja se da usando células inmovilizadas en carragenina a la misma temperatura.

Figura 3-7: Seguimiento a la producción de etanol en fermentación con miel

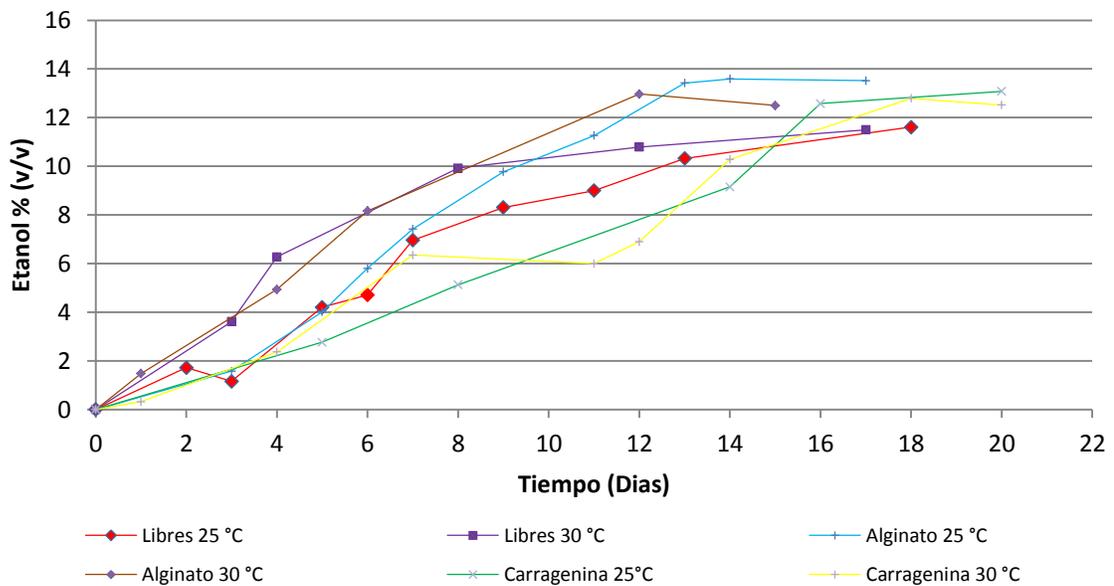
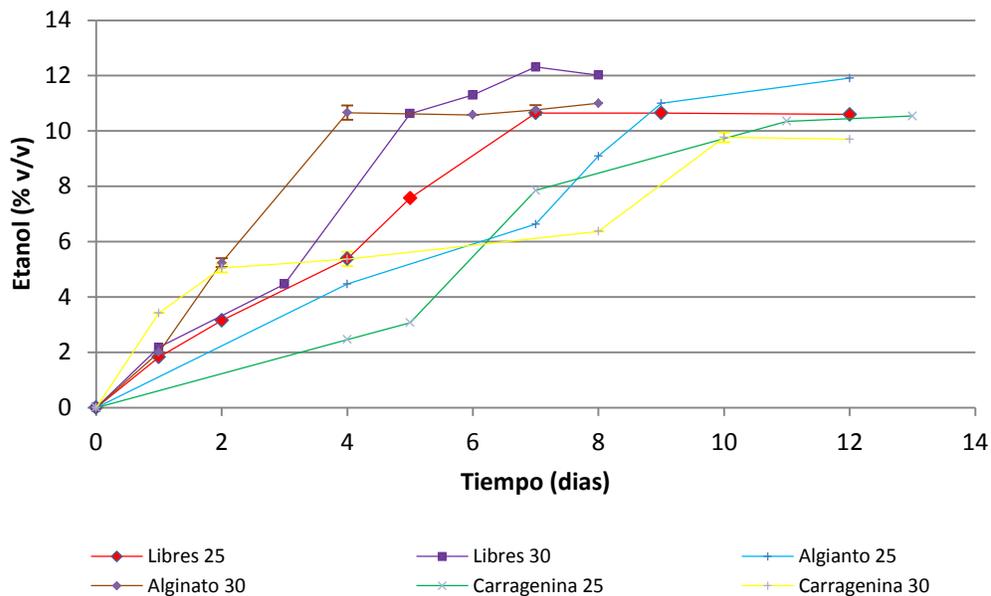


Figura 3-8: Seguimiento a la producción de etanol en fermentación con mielato



3.3.6 Rendimiento y productividad

Las tablas 3-9 y 3-10, muestran los resultados de rendimiento y productividad de los experimentos realizados. Los datos aquí reportados corresponden a los valores encontrados al final del proceso de fermentación de cada uno de los experimentos. El tiempo de fermentación final se estableció cuando el valor de los sólidos solubles mantuvo un valor constante en el tiempo.

El análisis estadístico mostrado en el (Anexo H) para la variable rendimiento indica que de los tres factores evaluados solo existieron diferencias según la forma en que se encontraba la célula, siendo significativamente mayor en las fermentaciones con células inmovilizadas en alginato (0.48 g etanol/ g de azúcar) en comparación a los valores obtenidos cuando se trabajó con células libres (0.41 g etanol/ g de azúcar) o inmovilizadas en carragenina (0.42 g etanol/ g de azúcar).

En la interacción presente entre el tipo de célula y temperatura el mejor rendimiento se da a 30 °C usando células inmovilizadas en alginato. En cambio en la interacción entre tipo de miel y tipo de célula los mayores rendimientos se alcanzan usando miel floral y células inmovilizadas en alginato.

Un análisis estadístico por separado para cada tipo de miel muestra que en la fermentación con miel floral este parámetro es significativamente menor (0.39 g etanol /g de azúcar) cuando se usan células libres en relación al uso de células inmovilizadas en alginato o carragenina (0.49 y 0.46 g etanol /g de azúcar).

Igualmente para el caso de la fermentación con miel de mielato el tipo de célula presentó diferencias significativas en la variable respuesta rendimiento, encontrándose que según el tipo de célula utilizado, esta fue menor cuando la levadura se encontraba inmovilizada en carragenina (0.39 g etanol/ g de azúcar) en comparación con las inmovilizadas en alginato (0.47 g etanol/ g de azúcar).

Para el caso de la productividad (Anexo I) los tres factores estudiados presentaron diferencias significativas: la productividad en fermentaciones con miel floral (0.36 g*L/h) fue menor que al usar miel de mielato (0.48 g*L/h) dado al mayor número de días que tardo la fermentación usando miel floral; igualmente los largos tiempos de fermentación causaron que el valor para productividad en la fermentación con células inmovilizadas en carragenina (0.35 g*L/h) fuera menor en comparación con las fermentaciones con células libres (0.45 (g*L/h) o inmovilizadas en alginato (0.47 g*L/h). Para el caso de la temperatura una mayor productividad se alcanzó a 30°C (0.46 g*L/h).

Según la interacción tipo de miel - tipo de célula la mayor productividad se da usando células libres a 30 °C. Para la interacción tipo de miel- temperatura este valor es más alto con miel de mielato a 30 °C y para la interacción tipo de célula temperatura la mejor condición se da usando células inmovilizadas en alginato a 30 °C.

Según un análisis estadístico teniendo en cuenta las fermentaciones con miel floral existieron diferencias según el tipo de célula donde los mejores resultados se presentaron usando células inmovilizadas en alginato (0.44 g*L/h) seguido de células libres (0.35 g*L/h) y células inmovilizadas en carragenina (0.31 g*L/h).

Respecto a la productividad alcanzada en la fermentación con miel de mielato tanto el tipo de célula como la temperatura presentaron diferencias significativas encontrándose una menor productividad en la fermentación con células inmovilizadas en carragenina (0.4 g*L/h) en contraste con la fermentación con levadura inmovilizada en alginato (0.5 g*L/h) o células libres (0.56 g*L/h). Para el caso de las dos temperaturas manejadas

cuando la fermentación se realizó a 30 °C se alcanzó un mayor valor de productividad (0.54 g*L/h) en comparación a la fermentación con 25 °C (0.43 g*L/h).

En la interacción presente entre el tipo de miel y la temperatura se mostró que la mayor productividad se alcanza realizando una fermentación con células libres a 30 °C.

Tabla 3-9: Evaluación de rendimiento y productividad en fermentación con miel usando células libres y células inmovilizadas.

Tratamiento	Etanol % (p/v)	Glicerol % (p/v)	Días	Rendimiento (g etanol /g)	Productividad (g/L-h)
Miel libres 25 °C	8.15 ±0.1	0.72 ±0.03	13	0.36 ±0.01	0.33 ±0
Miel libres 30 °C	8.51 ±0.37	0.63 ±0.07	12	0.43 ±0	0.37 ±0.02
Miel alginato 25°C	10.59 ±0	0.77 ±0.01	13	0.48 ±0.01	0.43 ±0
Miel alginato 30 °C	10.24 ±0.56	0.75 ±0.03	12	0.5 ±0.04	0.45 ±0.02
Miel Carragenina 25 °C	9.9 ±0.2	0.62 ±0.07	16	0.48 ±0.01	0.33 ±0.01
Miel Carragenina 30°C	10.09 ±0.22	0.7 ±0.08	18	0.44 ±0.03	0.3 ±0.01

Tabla 3-10: Evaluación de rendimiento y productividad en fermentación con mielato usando células libres y células inmovilizadas.

Tratamiento	Etanol % (p/v)	Glicerol (%p/v)	Días	Rendimiento (g etanol/g azúcar)	Productividad (g/L-h)
Mielato libres 25 °C	8.4 ±0.13	0.68 ±0	9	0.41 ±0.02	0.49 ±0.01
Mielato libres 30 °C	9.48 ±0.29	0.77 ±0.01	8	0.45 ±0	0.63 ±0.02
Mielato Alginato 25 °C	9.4 ±0.03	0.61 ±0.01	12	0.46 ±0	0.41 ±0
Mielato Alginato 30 °C	8.49 ±0.15	0.69 ±0.01	7.5	0.49 ±0	0.6 ±0.05
Mielato carragenina 25	8.17 ±0.52	0.62 ±0.08	11	0.39 ±0.05	0.39 ±0.02
Mielato Carragenina 30	7.71 ±0	0.68 ±0.01	10	0.38 ±0	0.41 ±0

Los resultados anteriores muestran que el proceso de inmovilización influye notoriamente en el proceso fermentativo, sin embargo cada matriz afecta de una forma distinta los parámetros de rendimiento y productividad del proceso.

Respecto a la concentración de glicerol ninguno de los tres factores evaluados presentó una diferencia significativa. Solo se presentan diferencias cuando se analiza por separado las fermentaciones con mielato donde se evidencia que las fermentaciones llevadas a cabo a 30 °C presentaban una mayor concentración de glicerol (0.71 g/l) en comparación con la fermentación realizada a 25°C (0.64 g/l). (Ver anexo J)

Tabla 3-11: Azúcares consumidos durante el proceso de fermentación

	Glucosa inicial (% p/v)	Glucosa final (% p/v)	Fructosa inicial (% p/v)	Fructosa final (% p/v)	Azúcares consumidos (% p/v)
Miel libres 25 °C	11.13 ±0.04	0.22 ±0.03	12.5 ±0.51	0.91 ±0.31	22.49 ±0.27
Miel libres 30 °C	10.49 ±0.69	0.27 ±0	10.62 ±1.46	0.92 ±0.05	19.91 ±0.82
Miel alginato 25°C	9.65 ±0.22	0.9 ±0.6	13.86 ±0.08	0.53 ±0.22	22.08 ±0.52
Miel alginato 30 °C	10 ±0.2	0 ±0	11 ±0.3	0.64 ±0.02	20.36 ±0.52
Miel Carragenina 25 °C	11 ±0.1	0.41 ±0	12 ±0	1.87 ±0.13	20.73 ±0.12
Miel Carragenina 30°C	11.5 ±0.71	0.23 ±0.14	12.4 ±0.6	0.78 ±0.08	22.9 ±1.1
Mielato libres 25 °C	10.5 ±0.4	0.13 ±0	11.29 ±0.33	1.05 ±0.04	20.61 ±0.77
Mielato libres 30 °C	9.86 ±0.05	0 ±0	11.2 ±0.3	0.17 ±0.06	20.89 ±0.41
Mielato Alginato 25 °C	10.3 ±0.23	0.21 ±0.07	11.02 ±0.2	0.75 ±0.41	20.37 ±0.08
Mielato Alginato 30 °C	10.2 ±0.19	0.94 ±0.02	10.71 ±0.32	2.75 ±0.4	17.22 ±0.13
Mielato carragenina 25 °C	9.8 ±0.7	0.6 ±0.4	12.3 ±0.6	0.57 ±0.2	20.93 ±1.1
Mielato Carragenina 30 °C	9.27 ±0.22	1.39 ±0.39	12.5 ±0.32	0.2 ±0.03	20.19 ±0.13

3.4 Análisis de componentes principales

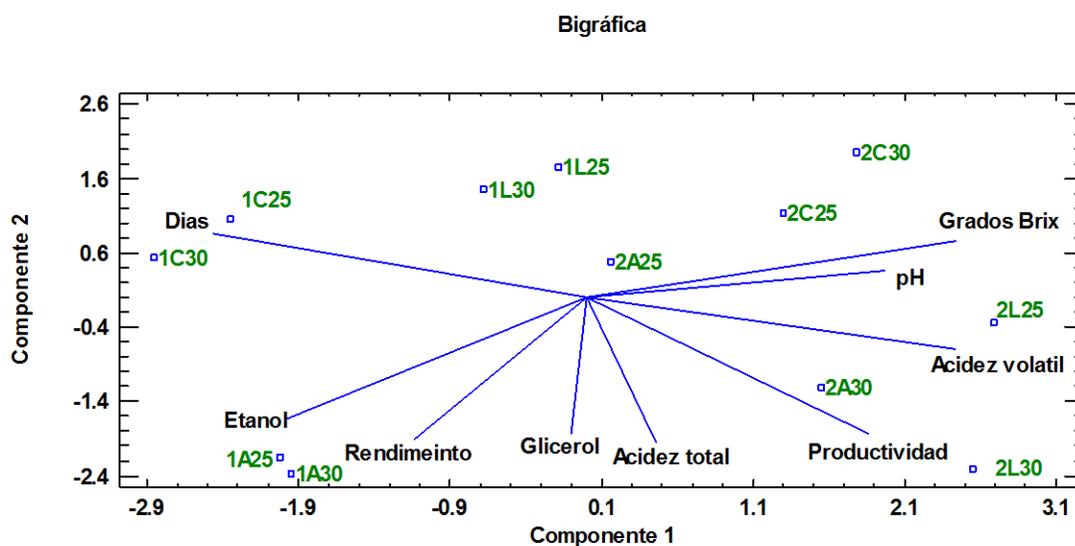
Se aplicó un análisis de componentes principales a las variables estudiadas, el cual muestra que los dos primeros componentes reportados en la tabla 3-12 explican el 72.9 % de la varianza. Los resultados del análisis pueden observarse en la figura 3-9 encontrándose relación en la mayoría de las variables estudiadas, por ejemplo un mayor valor en sólidos solubles finales “Grados Brix” que indica un menor consumo de azúcares, esta inversamente relacionado con la producción de etanol; la variable “días” por su parte que hace referencia al tiempo necesario para finalizar la fermentación es inversamente proporcional a la variable “productividad”, igualmente la concentración de etanol encontrada está directamente relacionada con la variable “rendimiento”.

Respecto a las muestras evaluadas no existió una agrupación entre las mismas. La fermentación usando miel en células inmovilizadas en alginato a 25°C (1A25) presenta una alta producción de etanol y un mayor rendimiento, para las fermentaciones con mielato en células libres a 25°C (2L25), mielato con células inmovilizadas en carragenina a 30 °C (2C30) y mielato con células inmovilizadas en carragenina a 25°C (2C25) la producción de etanol fue baja, resultado que concuerda con una baja disminución de sólidos solubles respecto a su valor inicial.

Tabla 3-12: Análisis de Componentes Principales

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje Acumulado
1	3.92076	43.564	43.564
2	2.64481	29.387	72.951
3	0.968442	10.760	83.711
4	0.714162	7.935	91.646
5	0.513807	5.709	97.355
6	0.133062	1.478	98.834
7	0.091319	1.015	99.848
8	0.0107484	0.119	99.968
9	0.00289028	0.032	100.000

Figura 3-9: Análisis de componentes principales para las variables estudiadas en la elaboración de hidromiel



Tipo de miel: 1 (miel floral) 2 (miel de mielato); tipo de célula: L (células libres) A (alginato) C (carragenina)
 temperatura: 25 °C (25) 30 °C (30)

3.5 Análisis sensorial

La tabla 3-13 muestra el análisis sensorial realizado a los productos elaborados respecto a las características gustativas, se observa que el hidromiel elaborado a partir de mielato presentó un menor grado alcohólico, menor tonalidad ácida y mayor tonalidad dulce respecto al fabricado a partir de miel; sin embargo según el análisis estadístico no se presentaron diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

La mayor intensidad de alcohol fue percibida en la fermentación resultante a partir de miel con células inmovilizadas en alginato a 30°C, células inmovilizadas en carragenina a 30°C e inmovilizadas en alginato 25°C. Las menores concentraciones de alcohol fueron percibidas en fermentaciones con miel de mielato y células libres a 30 °C, miel de mielato y células inmovilizadas en carragenina 30°C y miel de mielato con células inmovilizadas en alginato a 30°C. Las apreciaciones indicadas por los panelistas concuerdan con las concentraciones observadas en los análisis fisicoquímicos donde se evidencia que según el tipo de miel (floral o mielato) o la condición en que se encuentre la célula existen diferencias en la producción de alcohol.

Tabla 3-13: Análisis sensorial de los hidromieles elaborados (valores expresados en valor de mediana).

muestra	Dulce	Acido	Alcohol	Amargo	Cuerpo y equilibrio
Miel alginato 25	2.56	4.00	5.22	1.44	4.00
Miel alginato 30	2.71	4.57	5.29	1.43	3.71
Miel carragenina 25	2.50	4.00	4.88	1.50	3.63
Miel carragenina 30	2.63	4.13	5.25	2.25	2.88
Miel libres 25	3.13	4.00	4.88	2.00	3.88
Miel libres 30	3.13	4.00	4.63	1.63	3.75
Mielato alginato 25	2.56	3.33	4.67	1.44	3.67
Mielato alginato 30	3.00	3.75	4.25	1.50	3.50
Mielato carragenina 25	2.60	3.50	4.60	1.40	3.30
Mielato carragenina 30	3.00	3.10	4.00	1.40	2.50
Mielato libres 25	3.50	3.50	4.50	1.25	4.13
Mielato libres 30	4.00	2.88	3.88	1.38	2.88
valor P=	0.607433	0.173283	0.287885	0.764468	0.194811

Según las apreciaciones de los panelistas los hidromieles elaborados usando células inmovilizadas en carragenina presentan los valores más bajos principalmente en el parámetro de cuerpo y equilibrio, este parámetro es uno de los más importantes para definir la calidad del producto debido a que relaciona el equilibrio entre los demás

factores evaluados, por lo que una mala puntuación castiga fuertemente la apreciación de calidad.

Los resultados del análisis sensorial gustativo se pueden entender más fácilmente en los diagramas de araña presentados en las figuras 3-11 y 3-12 donde se observa que la fermentación con miel floral presenta mayor tonalidad alcohólica y menor tonalidad dulce en comparación con la fermentación con miel de mielato. El sabor amargo fue el menos percibido en todas las muestras evaluadas.

Figura 3-10: Análisis sensorial del hidromiel obtenido a partir de miel con células libres e inmovilizadas

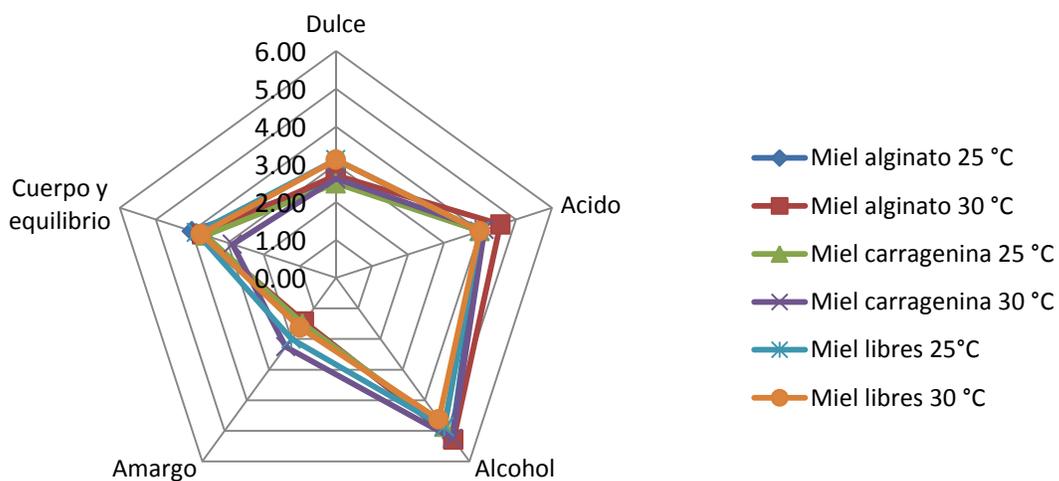
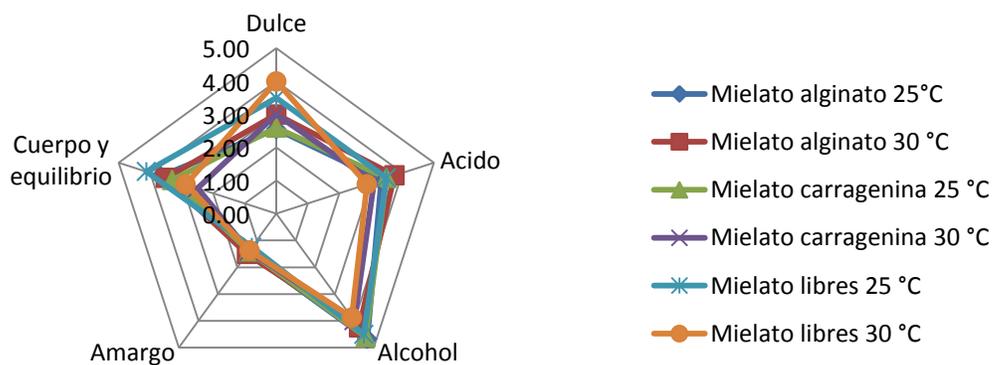


Figura 3-11: Análisis sensorial del hidromiel obtenido a partir de mielato con células libres e inmovilizadas



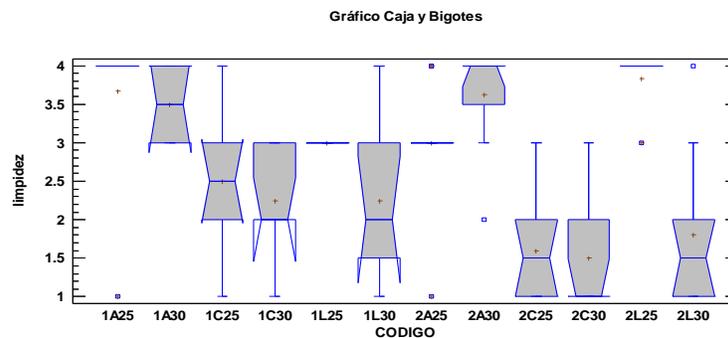
Análisis sensorial de parámetros visuales

La tabla 3-14 muestra la evaluación estadística de distintos parámetros visuales realizada por el panel entrenado. Según los resultados reportados se presentaron diferencias significativas para el parámetro limpidez. El análisis de muestras sobre la mediana indicado en la figura 3-12 muestra que los hidromieles con una mejor evaluación en el parámetro limpidez corresponden a los elaborados con miel floral e inmovilizada en su mayoría en esferas de alginato, por otra parte cuando se utiliza levadura inmovilizada en carragenina la evaluación tiende a ser más baja.

Tabla 3-14: Análisis sensorial de parámetros visuales

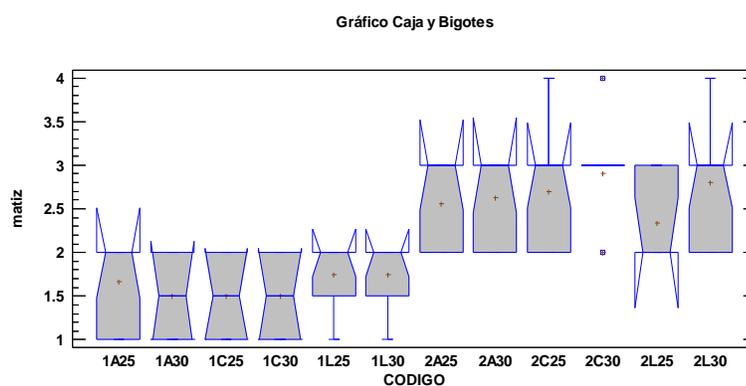
muestra	Limpidez	Matiz o tono	Intensidad de color	Lagrimas
1 A25	4.00	2.00	2.00	3.00
1 A30	3.50	1.50	2.00	2.00
1 C25	2.50	1.50	2.00	3.00
1 C30	2.00	1.50	2.00	2.00
1 L25	3.00	2.00	2.00	3.00
1L30	2.00	2.00	2.00	2.50
2 A25	3.00	3.00	3.00	3.00
2 A30	4.00	3.00	3.00	3.00
2 C25	1.00	3.00	2.00	3.00
2 C30	1.50	3.00	3.00	3.00
2L 25	4.00	2.00	3.00	2.50
2 L30	1.50	3.00	3.00	2.00
valor P=	1.19E-07	8.01E-08	0.324374	0.310095

Figura 3-12: Grafico de cajas y bigotes para variable limpidez



Para el parámetro matiz o tono también se presentaron diferencias entre los experimentos. El análisis de la gráfica de muescas de mediana de la figura 3-13 indica que estas diferencias se dan entre los dos tipos de miel utilizada, alcanzándose una valoración más alta en las fermentaciones con mieles de mielato. Lo anterior se debe principalmente a que las mieles de mielato por su composición tienen una tendencia a ser más oscuras que las mieles florales. Un análisis por separado para cada tipo de miel no mostró diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 3-13: Grafico de cajas y bigotes para variable matiz



Respecto a la Intensidad de color y la formación de lágrimas y piernas, según la evaluación del panel, tampoco se encontraron diferencias entre los hidromieles evaluados. Los resultados en este último parámetro concuerdan con los encontrados en el análisis fisicoquímico referente a la evaluación de concentración de glicerol donde tampoco se encontró diferencias entre los tratamientos.

La representación gráfica para el análisis visual de las muestras evaluadas se puede observar en las figuras 3.14 y 3.15

Figura 3-14: Evaluación sensorial de parámetros visuales en fermentación con Miel

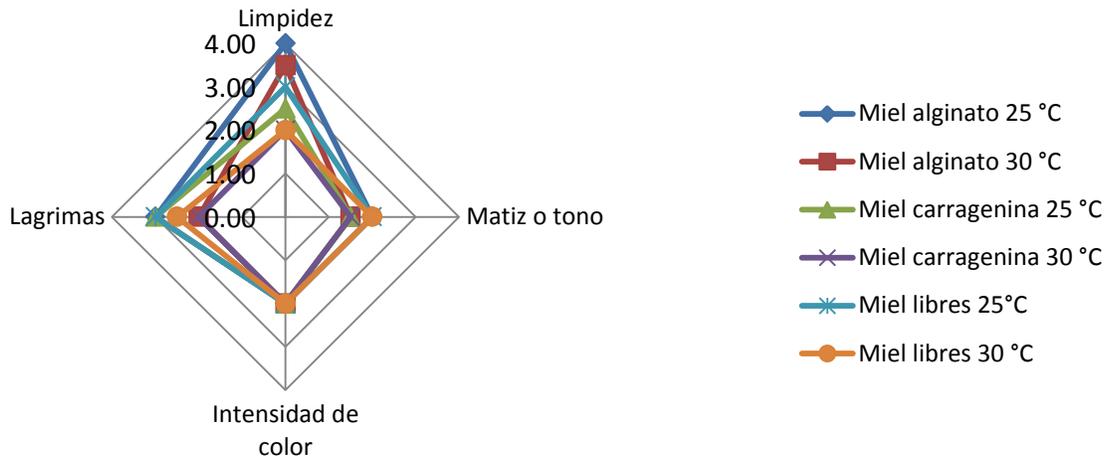
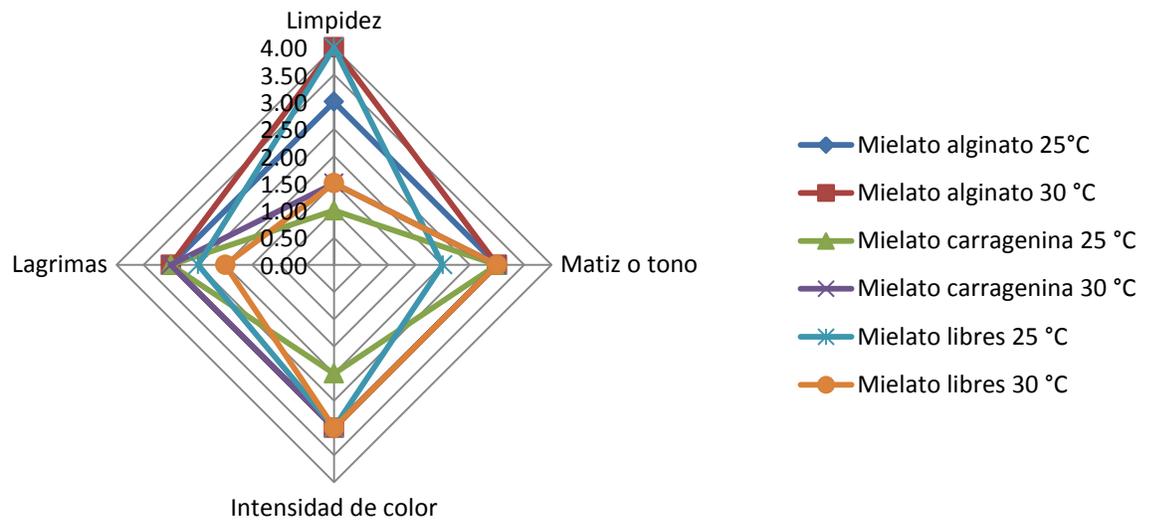


Figura 3-15: Evaluación sensorial de parámetros visuales en fermentación con mielato



Análisis sensorial de parámetros olfativos

Los parámetros evaluados de intensidad de olor, aroma y persistencia global son presentados en la tabla 3-15. El análisis estadístico no presentó diferencias significativas entre los 12 hidromieles evaluados.

Tabla 3-15: Análisis sensorial de parámetros olfativos

muestra	intensidad olor	intensidad aroma	persistencia global
1 A25	4.00	4.00	4.00
1 A30	4.50	4.00	3.00
1 C25	5.00	3.00	3.00
1 C30	5.00	4.00	3.50
1 L25	4.00	3.00	4.00
1L30	4.50	3.00	3.50
2 A25	3.00	3.00	3.00
2 A30	3.50	3.50	3.50
2 C25	4.00	3.00	3.00
2 C30	4.00	2.50	2.00
2L 25	4.00	4.00	4.00
2 L30	3.50	3.00	4.00
	0.722831	0.396442	0.193663

Figura 3-16: Evaluación sensorial olfativa de la fermentación alcohólica de miel

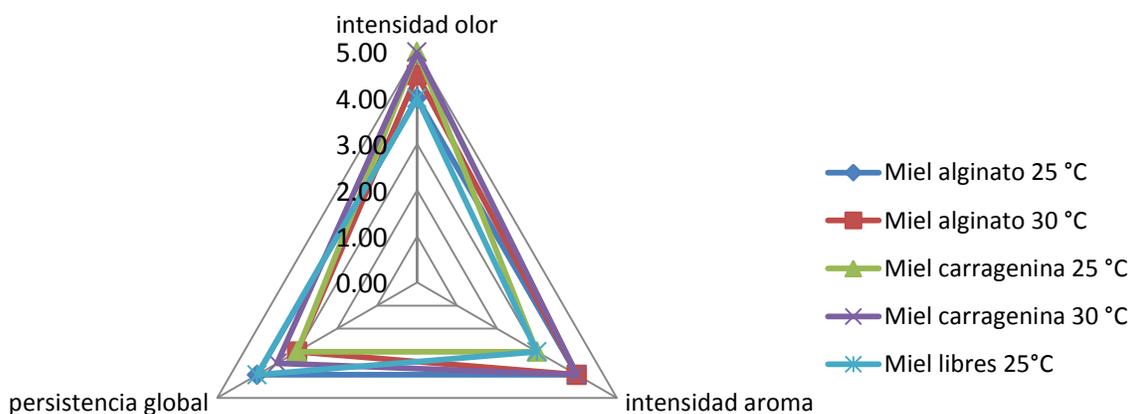
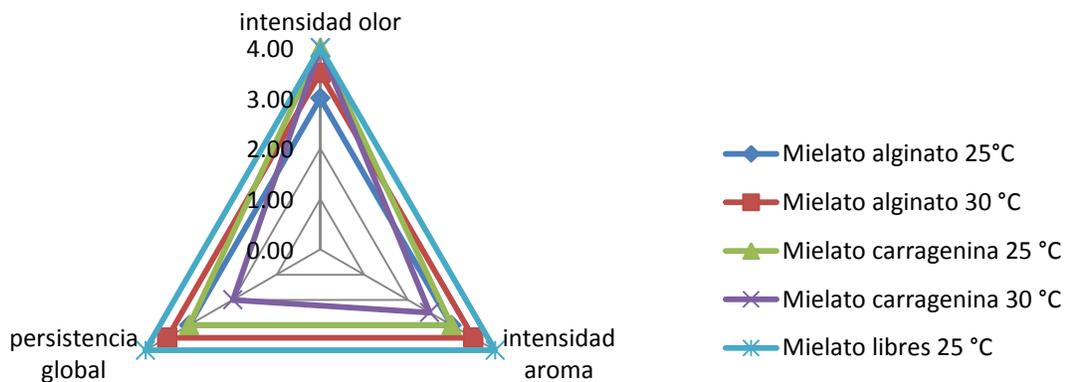


Figura 3-17: Evaluación sensorial olfativa de la fermentación alcohólica de mielato



3.6 Reutilización de células

Las esferas inmovilizadas en alginato se reutilizaron en cuatro fermentaciones sucesivas por lotes como se puede ver en la Tabla 3-17, sin encontrarse diferencias significativas en las variables estudiadas. Las esferas en carragenina no se lograron reutilizar debido a que éstas (aparentemente estables en el mosto de fermentación) se deformaron al intentar separarlas del producto fermentado tras la primera fermentación.

Para el caso de las células inmovilizadas en alginato resultados similares son reportados evaluándose el comportamiento durante fermentaciones repetidas conservando la capacidad de producción de etanol por parte de las levaduras (Iconomopoulou et al., 2002; Peinado et al., 2006; Tsakiris et al., 2004). Según estudios realizados con células inmovilizadas, la reutilización de las células en nuevas fermentaciones puede favorecer el proceso, ya que las células no tienen que adaptarse al mosto, por lo que la etapa lag o de adaptación se reduce (Caicedo, 1996). En este caso los tiempos de fermentación no se vieron notablemente favorecidos, salvo en la fermentación de miel con células inmovilizadas en esferas de alginato, lo que coincide con lo reportado por Puig *et al.* (2010) donde reporta un menor tiempo de fermentación en la primera respecto a las fermentaciones siguientes.

Kourkoutas et al. (2003) usando células inmovilizadas en la fermentación de vino demostraron estabilidad en fermentaciones por lotes repetidas en parámetros tales como

concentración de etanol, acidez total y volátil y tiempo de fermentación, lo cual también coincide con lo encontrado en esta investigación.

75 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Tabla 3-16: Evaluación fisicoquímica de las fermentaciones sucesivas con células inmovilizadas en alginato.

Miel alginato 25°C							
Numero de fermentación	Tiempo (Días)	Etanol (p/v)	Acidez total	Acidez volátil	Glicerol (p/v)	Rendimiento (g etanol/g azúcar)	Productividad (g/L-h)
1	20 ^a	12.95±0.83 ^a	4.17 ^a	0.23 ^a	0.61±0.01 ^a	0.48±0.08 ^a	0.27±0.02 ^a
2	17 ^b	12.12±0 ^a	3.82 ^a	0.19 ^a	0.66±0 ^a	0.48±0 ^a	0.3±0 ^a
3	20 ^a	13.24±0 ^a	4.03 ^a	0.17 ^a	0.69±0 ^a	0.49±0.08 ^a	0.28±0 ^a
4	12 ^c	11.76±1.55 ^a	4.00 ^a	0.21 ^a	0.59±0.25 ^a	0.5±0.05 ^a	0.41±0.05 ^a

Miel alginato 30°C							
Numero de fermentación	Tiempo (Días)	Etanol (p/v)	Acidez total	Acidez volátil	Glicerol (p/v)	Rendimiento (g etanol/g azúcar)	Productividad (g/L-h)
1	11 ^a	12.98±0.72 ^a	4.15 ^a	0.24 ^a	0.83±0.06 ^a	0.5±0.03 ^a	0.49±0.03 ^a
2	13 ^b	11.57±0.22 ^a	3.98 ^a	0.19 ^a	0.78±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a	0.37±0.01 ^b
3	13 ^b	12.8±0 ^a	4.01 ^a	0.25 ^a	0.89±0 ^a	0.5±0 ^a	0.41±0 ^b
4	16 ^c	12.52±0 ^a	3.8 ^a	0.23 ^a	0.86±0 ^a	0.48±0 ^a	0.33±0 ^c

Mielato Alginato 25 °C							
Numero de fermentación	Tiempo (Días)	Etanol (p/v)	Acidez total	Acidez volátil	Glicerol (p/v)	Rendimiento (g etanol/g azúcar)	Productividad (g/L-h)
1	10 ^a	10.62±1.32 ^a	3.60 ^a	0.36 ^a	0.61±0.01 ^a	0.40 ±0.08 ^a	0.44±0.06 ^a
2	14 ^b	8.86±1.22 ^a	3.72 ^a	0.34 ^a	0.62±0 ^a	0.46±0.06 ^a	0.26±0.04 ^c
3	11 ^c	11.11±0.28 ^a	3.9 ^a	0.32 ^a	0.62±0 ^a	0.46±0.01 ^a	0.42±0.01 ^{ab}
4	15 ^d	10.23±0.81 ^a	3.63 ^a	0.38 ^a	06±0 ^a	0.43±0.03 ^a	0.28±0.02 ^{ac}

Mielato Alginato 30 °C							
Numero de fermentación	Tiempo (Días)	Etanol (p/v)	Acidez total	Acidez volátil	Glicerol (p/v)	Rendimiento (g etanol/g azúcar)	Productividad (g/L-h)
1	7 ^a	10.95±0 ^a	3.63 ^a	0.39 ^a	0.69 ^a	0.49±0 ^a	0.65±0 ^a
2	7 ^a	8.78±0.47 ^a	3.72 ^a	0.42 ^a	0.54 ^a	0.44±0.02 ^b	0.52±0.03 ^b
3	7 ^a	9.69±0 ^a	3.67 ^a	0.37 ^a	0.68 ^a	0.49±0 ^b	0.58±0 ^b
4	11 ^b	9.95±0 ^a	3.65 ^a	0.38 ^a	0.45 ^a	0.5±0 ^b	0.38±0 ^c

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El uso de carragenina como matriz de inmovilización en el proceso de elaboración de hidromiel fue evaluado por primera vez en esta investigación. Las mejores condiciones para el proceso de inmovilización se dieron usando una concentración de 3% de carragenina en cloruro de potasio al 16%; bajo estas condiciones las esferas formadas presentaron las mejores características en cuando a dureza (3.51 g-f) y elasticidad (0.89) logrando mantenerse estables en el mosto de fermentación con un incremento tras las primeras horas de estar en contacto con el mosto. La viabilidad de levadura encontrada al finalizar la primera fermentación fue superior al 90% con un recuento de 10^7 ufc/ml. Una alta fragilidad de las esferas impidió que estas sean reutilizadas en nuevas fermentaciones.

La inmovilización de levadura en esferas de alginato es un proceso sencillo y de fácil manejo. La concentración utilizada de 1,5 % m/v de alginato de sodio y 0.05 M permitió la formación de geles de buena dureza y estabilidad durante el proceso de fermentación. Una buena concentración de células (10^7 ufc/ml) una buena viabilidad (mayor al 90%) y una alta estabilidad mostrada por parte de las esferas tras terminada la primera fermentación permitió su reutilización nuevas fermentaciones.

Los tres factores evaluados en esta investigación (tipo de miel, tipo de célula y temperatura) al igual que la interacción entre estos influyen notoriamente en la mayoría de los parámetros evaluados en la elaboración de hidromiel.

La concentración de etanol se ve influenciada por tipo de miel, el tipo de célula y la interacción tipo de miel – tipo de célula y tipo de célula-temperatura. Las mayores concentraciones de etanol se dieron en miel floral (12.14 %v/v) y células inmovilizadas en alginato (12.26 %v/v). Para las dos interacciones presentes la combinación de miel floral, células inmovilizadas en alginato y/o una temperatura de 30 °C presentan los

mejores resultados. La inmovilización en esferas de carragenina es favorable en la fermentación con miel floral más no en la fermentación con miel de mielato donde se obtuvo las concentraciones más bajas de etanol.

La acidez total, parámetro importante en este tipo de bebidas se vio influenciada por el tipo de célula utilizado y la interacción tipo de miel- tipo de célula y tipo de miel temperatura. La fermentación con levadura inmovilizada en carragenina reporta la menor concentración para este parámetro (3.56 g/L de ácido tartárico) valor muy cercano al mínimo permitido para bebida alcohólica tipo vino (según legislación colombiana). Según las interacciones dadas la menor concentración se dan usando miel floral y células inmovilizadas en carragenina o miel floral y una temperatura de 25°C.

El rendimiento en el proceso de fermentación estuvo influenciado por el tipo de célula utilizado y la interacción entre factores. Los mejores resultados se alcanzaron en los procesos con células inmovilizadas en alginato (0.48 g etanol/ g de azúcar) no existiendo diferencias entre los otros dos tipos de células. Para el caso de las interacciones presentes los mayores rendimientos se alcanzan usando miel floral y células en alginato o este mismo tipo de células con una temperatura de 30°C.

La productividad fue influenciada por todos los factores evaluados (tipo de miel, tipo de célula y temperatura) así como la interacción entre ellos. Los valores más altos en productividad se alcanzan usando miel de mielato (0.48 g/L-h), células inmovilizadas en alginato (0.47 g/L-h) y temperatura de 30°C (0.46 g/L-h). Para el caso de tipo de célula, las levaduras inmovilizadas en carragenina presentaron el valor más bajo para este parámetro. Las interacciones entre factores relacionadas con una mayor productividad serían: miel floral – células libres, miel de mielato -30°C y células en alginato a 30 °C. La existencia de una mayor productividad en miel de mielato se debe a un tiempo menor de fermentación.

El análisis sensorial realizado con un panel entrenado pudo corroborar que el hidromiel elaborado a partir de mielato presentó un menor grado alcohólico, menor tonalidad ácida y mayor tonalidad dulce respecto al fabricado a partir de miel; sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre las muestra. La mayor intensidad de alcohol fue percibida en la fermentación resultante a partir de miel floral con células inmovilizadas en alginato a 30°C, células inmovilizadas en carragenina a 30°C e inmovilizadas en alginato a 25°C. Estos resultados coinciden con los análisis fisicoquímicos realizados a

los productos terminados. Dada la tendencia a la desintegración que presentaron las esferas de carragenina las evaluaciones de turbidez para los hidromieles con esta matriz fueron desfavorables, caso contrario ocurre con el uso de levadura inmovilizada en alginato donde el valor de turbidez fue más bajo con respecto a las demás muestras evaluadas.

Las células de levadura inmovilizadas en esferas de alginato lograron ser reutilizadas en cuatro oportunidades en fermentaciones por lotes no encontrándose diferencias entre cada fermentación para las variables estudiadas (etanol, acidez total y acidez volátil, rendimiento y productividad)

4.2 Recomendaciones

Se recomienda completar el estudio realizado apoyándose con microscopía electrónica que permitan evaluar la inmovilización de la levadura en la matriz de alginato o carragenina.

Se recomienda para estudios posteriores, evaluar el comportamiento de la levadura inmovilizada bajo diferentes condiciones de estrés que permitan entender mejor el comportamiento de las levaduras inmovilizadas.

Se recomienda evaluar el efecto del diámetro de la esfera en los parámetros de rendimiento y productividad de la fermentación.

5. Anexos

Anexo A: Formato para evaluación sensorial aplicada a hidromieles.



PROSPERIDAD
PARA TODOS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

CALIDAD E INOCUIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROMIEL.

ANÁLISIS SENSORIAL DESCRIPTIVO DE HIDROMIELES.

Nombre: _____ Fecha: _____

Frente a usted encontrará un grupo de muestras codificadas. Por favor, evalúelas de izquierda a derecha. Usted debe evaluarlas de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados. NO inicie con otra muestra hasta no terminar de diligenciar todo el formato. Recuerde enjuagar su boca entre muestra y muestra.

Muestra: _____

1. Evaluación visual.

☞ **Limpidez:** Seleccionar uno o varios

- Turbio
- Mate
- Limpio
- Brillante

☞ **Matiz o tono:** Seleccionar uno

- Amarillo claro
- Amarillo
- Amarillo quemado
- Ocre
- Café
- Ámbar
- Otro _____

☞ **Intensidad del color:** Seleccionar uno

- Débil
- Ligero
- Medio
- Fuerte

☞ **Lágrimas, piemas, fluidez:** Seleccionar una

- No presenta
- Cortas
- Medias
- Largas

2. Evaluación olfativa.

☞ **Intensidad del olor** **Complejidad de olores**

1 2 3 4 5 6 7

DESARROLLO DE UN MODELO PRODUCTIVO DE BEBIDAS FERMENTADAS DE MIEL COMO ESTRATEGIA PARA GENERAR VALOR EN EL ÁMBITO CARACTERÍSTICO DE LA APICULTURA EN COLOMBIA.



PROSPERIDAD
PARA TODOS



CALIDAD E INCIUDAD EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROMIEL.

Intensidad de aroma
 1 2 3 4 5 6 7

Complejidad de aroma

Defectos de olor y aroma: Seleccionar uno o varios:

- Láctico
- Moho
- Herbáceo
- Corcho
- Picado
- Pegamento
- Oxidado
- Geranio
- Huevos podridos
- Lias
- Sulfuroso
- Cocido
- Otro

Persistencia global: Seleccionar la persistencia global de la muestra.

1 2 3 4 5 6 7

3. Evaluación gustativa.

Intensidad del sabor: Seleccionar un nivel

- Débil
- Moderado
- Potente

Intensidad del dulce

1 2 3 4 5 6 7

Intensidad del ácido

1 2 3 4 5 6 7

Intensidad de alcohol

1 2 3 4 5 6 7

Intensidad de amargo

1 2 3 4 5 6 7

Dulzor: Seleccionar un nivel

- Seco
- Semiseco
- Dulce



COLCIENCIAS
Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación

**PROSPERIDAD
PARA TODOS**



CALIDAD E INOCUIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE HIDROMIEL.

☞ **Acidez:** Seleccionar un nivel

- Plana
Vivo/fresco
Excesivo

☞ **Amargor:** Seleccionar un nivel

- Bajo
Medio
Alto

☞ **Astringencia:** Seleccionar un nivel

- Baja
Media
Alta

☞ **Arista presente:** Seleccionar una:

- Dulce
Amargo
Acido
Ninguna

☞ **Cuerpo y equilibrio:** Seleccionar un nivel

- 1 2 3 4 5 6 7

Comentarios generales

Muchas gracias por su colaboración.

84 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Anexo B: Análisis estadísticos para disminución de grados Brix

Análisis de Varianza para Grados Brix - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	19.6204	1	19.6204	376.71	0
B:Tipo de célula	22.8258	2	11.4129	219.13	0
C:Temperatura	0.700417	1	0.700417	13.45	0.0032
INTERACCIONES					
AB	4.35583	2	2.17792	41.82	0
AC	0.0704167	1	0.0704167	1.35	0.2675
BC	0.235833	2	0.117917	2.26	0.1465
ABC	0.905833	2	0.452917	8.7	0.0046
RESIDUOS	0.625	12	0.0520833		
TOTAL (CORREGIDO)	49.3396	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Tipo de miel

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	9.75	0.0658808	X
2	12	11.5583	0.0658808	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-1.80833	0.202999

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	8	9.65	0.0806872	X
3	8	10.3375	0.0806872	X
1	8	11.975	0.0806872	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	2.325	0.248622
01-mar	*	1.6375	0.248622

02-mar * -0.6875 0.248622

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	10.4833	0.0658808	X
2	12	10.825	0.0658808	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.341667	0.202999

* indica una diferencia significativa.

Gráfico de Interacciones

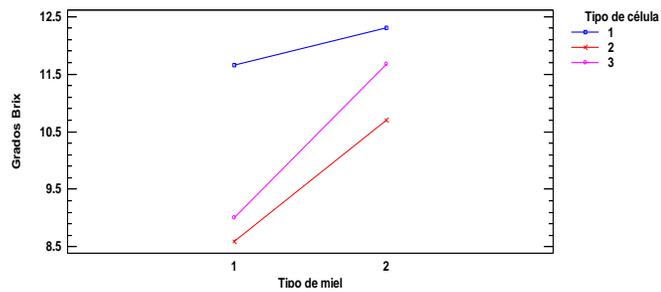


Gráfico de Interacciones

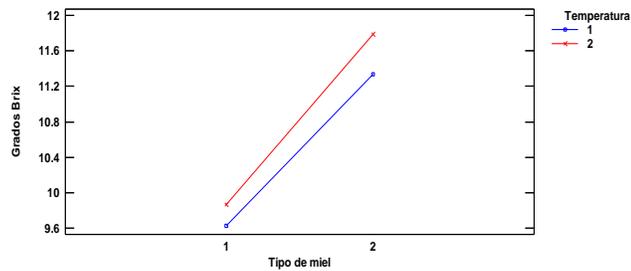
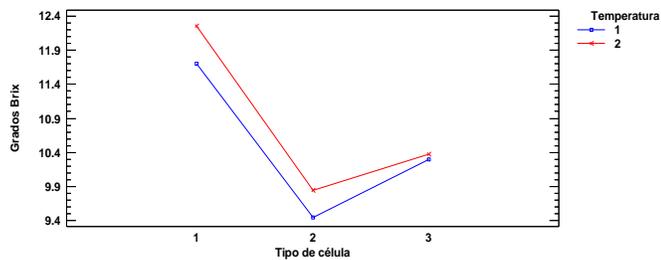


Gráfico de Interacciones



Estadística para solidos solubles en fermentación con miel floral

86 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Análisis de Varianza para Grados Brix - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	21.98	2	10.99	219.8	0
B:Temperatura	0.163333	1	0.163333	3.27	0.1207
INTERACCIONES					
AB	0.686667	2	0.343333	6.87	0.0281
RESIDUOS	0.3	6	0.05		
TOTAL	23.13	11			
(CORREGIDO)					
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	4	8.6	0.111803	X
3	4	9	0.111803	X
1	4	11.65	0.111803	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	3.05	0.386892
01-mar	*	2.65	0.386892
02-mar	*	-0.4	0.386892

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Temperatura

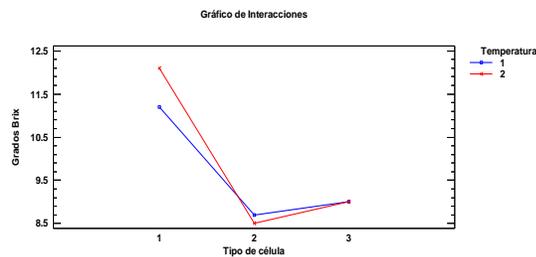
Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	9.63333	0.0912871	X
2	6	9.86667	0.0912871	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.233333	0.315896

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES



Estadística para sólidos solubles en fermentación con miel de mielato

Análisis de Varianza para Grados Brix - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	5.20167	2	2.60083	48.02	0.0002
B:Temperatura	0.6075	1	0.6075	11.22	0.0154
INTERACCIONES					
AB	0.455	2	0.2275	4.2	0.0723
RESIDUOS	0.325	6	0.0541667		
TOTAL	6.58917	11			
(CORREGIDO)					
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	4	10.7	0.116369	X
3	4	11.675	0.116369	X
1	4	12.3	0.116369	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	1.6	0.40269
01-mar	*	0.625	0.40269
02-mar	*	-0.975	0.40269

* indica una diferencia significativa.

88 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Pruebas de Múltiple Rangos para Grados Brix por Temperatura

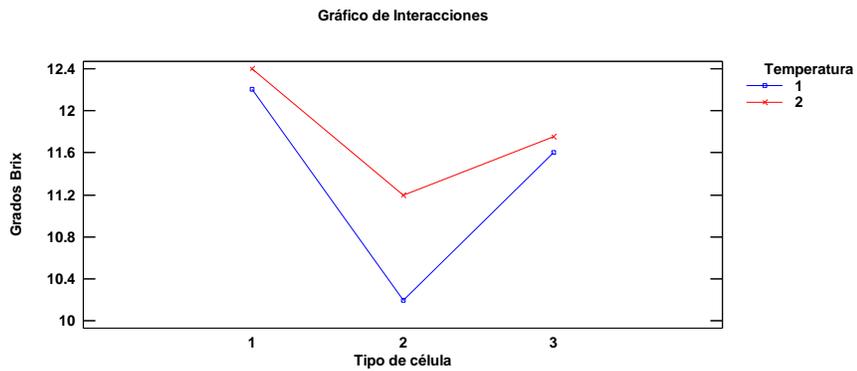
Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	11.3333	0.0950146	X
2	6	11.7833	0.0950146	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.45	0.328795

* indica una diferencia significativa.

Interacciones



Anexo C: Análisis estadísticos para Acidez total

Análisis de Varianza para Acidez (g ácido tartárico /L) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	0.0287042	1	0.0287042	1.05	0.3252
B:Tipo de célula	0.524758	2	0.262379	9.62	0.0032
C:Temperatura	0.0210042	1	0.0210042	0.77	0.3974
INTERACCIONES					
AB	1.32826	2	0.664129	24.35	0.0001
AC	0.262504	1	0.262504	9.63	0.0091
BC	0.121758	2	0.0608792	2.23	0.1499
ABC	0.357058	2	0.178529	6.55	0.012
RESIDUOS	0.32725	12	0.0272708		
TOTAL (CORREGIDO)	2.9713	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Tipo de miel

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	3.73833	0.0476715	X
2	12	3.8075	0.0476715	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.0691667	0.146891

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	8	3.565	0.0583854	X
1	8	3.8575	0.0583854	X
2	8	3.89625	0.0583854	X

90 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.03875	0.179904
01-mar	*	0.2925	0.179904
02-mar	*	0.33125	0.179904

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Temperatura

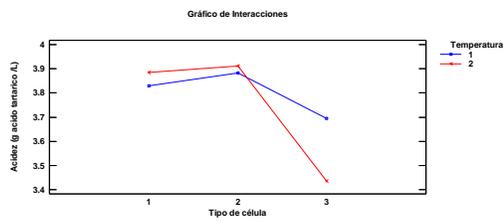
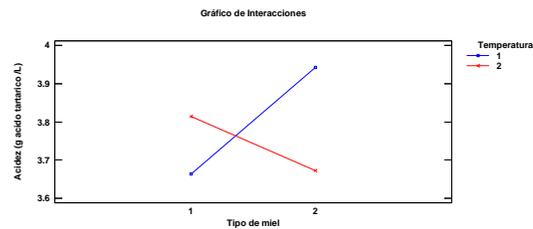
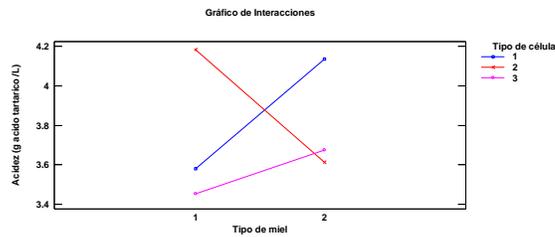
Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	3.74333	0.0476715	X
1	12	3.8025	0.0476715	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.0591667	0.146891

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES



Estadística para Acidez total en fermentación con miel floral

Análisis de Varianza para Acidez (g ácido tartárico /L)

- Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	1.20167	2	0.600833	93.39	0
B:Temperatura	0.0675	1	0.0675	10.49	0.0177
INTERACCIONES					
AB	0.0366	2	0.0183	2.84	0.1352
RESIDUOS	0.0386	6	0.00643333		
TOTAL (CORREGIDO)	1.34437	11			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	3.455	0.040104	X
1	4	3.58	0.040104	X
2	4	4.18	0.040104	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.6	0.138779
01-mar		0.125	0.138779
02-mar	*	0.725	0.138779

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

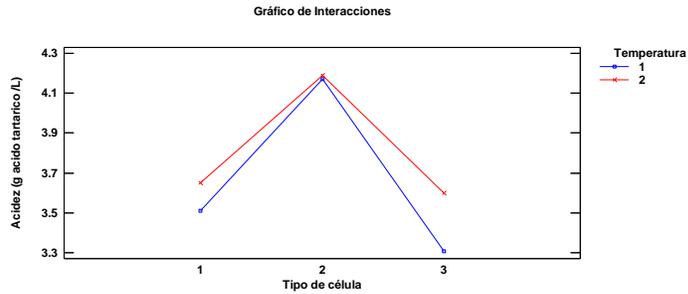
Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	3.66333	0.0327448	X
2	6	3.81333	0.0327448	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.15	0.113312

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES

92 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



Estadística para Acidez total en fermentación con miel de mielato

Análisis de Varianza para Acidez (g ácido tartárico /L)

- Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de célula	0.65135	2	0.325675	6.77	0.029
B: Temperatura	0.216008	1	0.216008	4.49	0.0784
INTERACCIONES					
AB	0.442217	2	0.221108	4.6	0.0616
RESIDUOS	0.28865	6	0.0481083		
TOTAL (CORREGIDO)	1.59823	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	3.67333	0.0895436	X
1	6	3.94167	0.0895436	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.268333	0.309862

* indica una diferencia significativa.

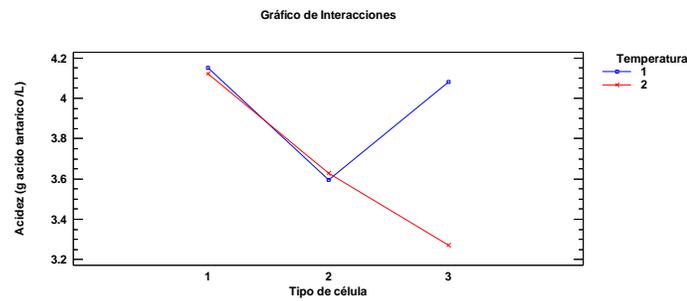
 Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez (g ácido tartárico /L) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	4	3.6125	0.109668	X
3	4	3.675	0.109668	X
1	4	4.135	0.109668	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	0.5225	0.379502
01-mar	*	0.46	0.379502
02-mar		-0.0625	0.379502

* indica una diferencia significativa.

Interacciones

94 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Anexo D: Análisis estadísticos para pH

Análisis de Varianza para pH - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	0.442817	1	0.442817	366.47	0.0000
B:Tipo de célula	0.0571583	2	0.0285792	23.65	0.0001
C:Temperatura	0.0294	1	0.0294	24.33	0.0003
INTERACCIONES					
AB	0.0250583	2	0.0125292	10.37	0.0024
AC	0.00806667	1	0.00806667	6.68	0.0239
BC	0.023275	2	0.0116375	9.63	0.0032
ABC	0.0409083	2	0.0204542	16.93	0.0003
RESIDUOS	0.0145	12	0.00120833		
TOTAL (CORREGIDO)	0.641183	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de miel

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	3.62333	0.0100347	X
2	12	3.895	0.0100347	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.271667	0.0309199

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	8	3.70375	0.0122899	X
1	8	3.75125	0.0122899	X
3	8	3.8225	0.0122899	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	0.0475	0.037869

01-mar	*	-0.07125	0.037869
02-mar	*	-0.11875	0.037869

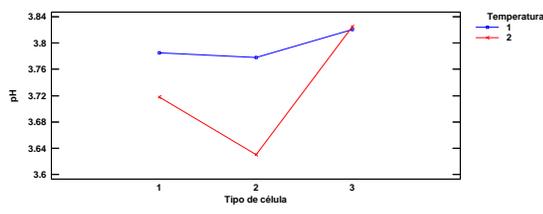
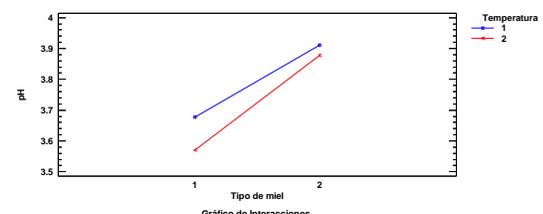
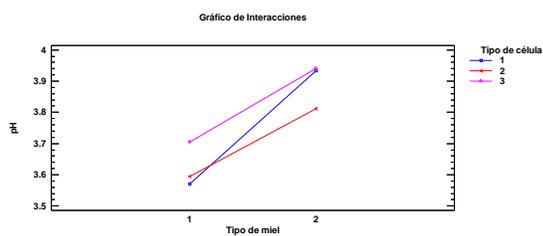
Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	3.72417	0.0100347	X
1	12	3.79417	0.0100347	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	0.07	0.0309199

INTERACCIONES



Estadística para pH en fermentación con miel floral

Análisis de Varianza para pH - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.0412667	2	0.0206333	12.14	0.0078
B:Temperatura	0.0341333	1	0.0341333	20.08	0.0042
INTERACCIONES					
AB	0.00246667	2	0.00123333	0.73	0.5222
RESIDUOS	0.0102	6	0.0017		

96 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

TOTAL 0.0880667 11
(CORREGIDO)

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	3.57	0.0168325	X
1	6	3.67667	0.0168325	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	0.106667	0.0582483

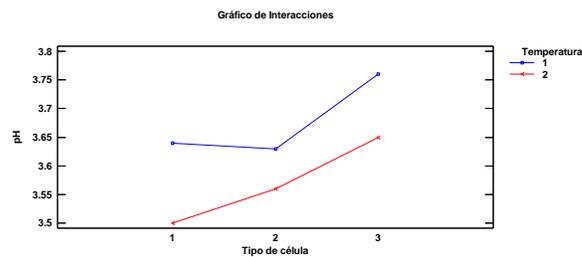
Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	3.57	0.0206155	X
2	4	3.595	0.0206155	X
3	4	3.705	0.0206155	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.025	0.0713393
01-mar	*	-0.135	0.0713393
02-mar	*	-0.11	0.0713393

INTERACCIONES



Estadística para pH en fermentación con miel de mielato

Análisis de Varianza para pH - Suma de Cuadrados

Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.04095	2	0.020475	28.57	0.0009
B:Temperatura	0.00333333	1	0.00333333	4.65	0.0744
INTERACCIONES					
AB	0.0617167	2	0.0308583	43.06	0.0003
RESIDUOS	0.0043	6	0.00071667		
TOTAL (CORREGIDO)	0.1103	11			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	4	3.8125	0.0133853	X
1	4	3.9325	0.0133853	X
3	4	3.94	0.0133853	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	0.12	0.0463194
01-mar		-0.0075	0.0463194
02-mar	*	-0.1275	0.0463194

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para pH por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

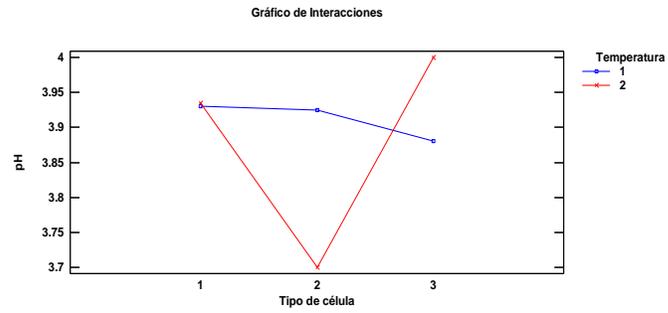
Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	3.87833	0.0109291	X
1	6	3.91167	0.0109291	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.0333333	0.0378196

* indica una diferencia significativa.

98 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

INTERACCION

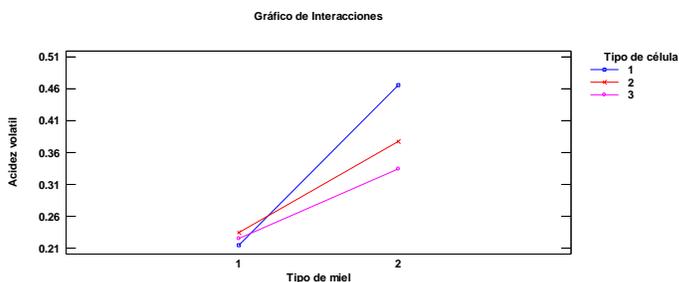


Anexo E: Análisis estadístico para acidez volátil

Análisis de Varianza para Acidez volátil - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	0.168337	1	0.168337	74.13	0
B:Tipo de célula	0.014475	2	0.0072375	3.19	0.0776
C:Temperatura	0.00120417	1	0.00120417	0.53	0.4805
INTERACCIONES					
AB	0.021475	2	0.0107375	4.73	0.0306
AC	0.0009375	1	0.0009375	0.41	0.5326
BC	0.00660833	2	0.00330417	1.46	0.2718
ABC	0.000975	2	0.0004875	0.21	0.8098
RESIDUOS	0.02725	12	0.00227083		
TOTAL (CORREGIDO)	0.241262	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez volátil por Tipo de miel				
Método: 95.0 porcentaje LSD				
Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	0.225	0.0137563	X
2	12	0.3925	0.0137563	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites	
01-feb	*	-0.1675	0.0423875	
* indica una diferencia significativa.				

INTERACCIONES



Análisis estadístico para acidez volátil en fermentación con miel

Análisis de Varianza para Acidez volátil - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.0008	2	0.0004	0.3	0.7538
B:Temperatura	0.00213333	1	0.00213333	1.58	0.2554
INTERACCIONES					
AB	0.00606667	2	0.00303333	2.25	0.1869
RESIDUOS	0.0081	6	0.00135		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0171	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis estadístico para fermentación con mielato

Análisis de Varianza para Acidez volátil - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.03515	2	0.017575	5.51	0.0439
B:Temperatura	8.3333E-06	1	8.3333E-06	0	0.9609
INTERACCIONES					
AB	0.00151667	2	0.00075833	0.24	0.7956
RESIDUOS	0.01915	6	0.00319167		
TOTAL (CORREGIDO)	0.055825	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Acidez volátil por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.335	0.0282474	X
2	4	0.3775	0.0282474	XX
1	4	0.465	0.0282474	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.0875	0.0977492
01-mar	*	0.13	0.0977492
02-mar		0.0425	0.0977492

*** indica una diferencia significativa.**

102 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Anexo F: Análisis estadísticos para concentración de etanol

Análisis de Varianza para Etanol % (v/v) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de miel	9.11557	1	9.11557	36.14	0.0001
B: Tipo de célula	7.32513	2	3.66257	14.52	0.0006
C: Temperatura	0.00165004	1	0.00165004	0.01	0.9369
INTERACCIONES					
AB	12.615	2	6.30749	25.01	0.0001
AC	0.062322	1	0.062322	0.25	0.6281
BC	3.01035	2	1.50518	5.97	0.0159
ABC	0.926262	2	0.463131	1.84	0.2015
RESIDUOS	3.02663	12	0.252219		
TOTAL (CORREGIDO)	36.0829	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol % (v/v) por Tipo de miel					
Método: 95.0 porcentaje LSD					
Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
2	12	10.9101	0.144977	X	
1	12	12.1427	0.144977	X	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
01-feb	*	1.23258	0.446719		

Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol % (v/v) por Tipo de célula					
Método: 95.0 porcentaje LSD					
Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
1	8	10.9438	0.17756	x	
3	8	11.3669	0.17756	x	
2	8	12.2685	0.17756	x	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
01-feb	*	-1.32475	0.547117		
01-mar		-0.423125	0.547117		

02-mar	*	0.901625	0.547117
--------	---	----------	----------

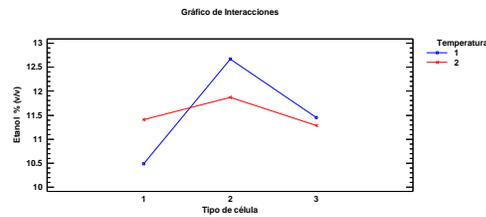
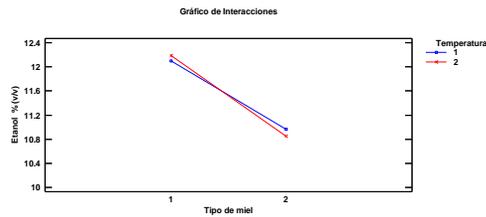
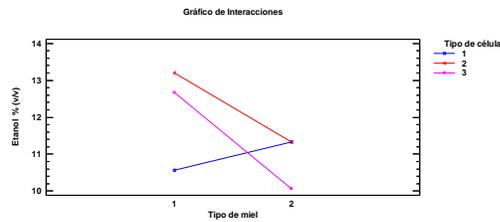
Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol % (v/v) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	11.5181	0.144977	X
1	12	11.5347	0.144977	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.0165833	0.446719

Interacciones



Estadística para etanol en fermentación con miel floral

Análisis de Varianza para Etanol % (v/v) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de célula	15.6373	2	7.81863	26.38	0.0011
B: Temperatura	0.0218453	1	0.0218453	0.07	0.7951
INTERACCIONES					
AB	0.454961	2	0.22748	0.77	0.5049
RESIDUOS	1.77847	6	0.296412		

104 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

TOTAL (CORREGIDO)	17.8925	11
--------------------------	---------	----

Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol % (v/v) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	10.5575	0.272219	X
3	4	12.6705	0.272219	X
2	4	13.2	0.272219	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-2.6425	0.942003
01-mar	*	-2.113	0.942003
02-mar		0.5295	0.942003

Estadística para etanol en fermentación con miel de mielato

Análisis de Varianza para Etanol % (v/v) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	4.30286	2	2.15143	10.34	0.0114
B:Temperatura	0.0421267	1	0.0421267	0.2	0.6685
INTERACCIONES					
AB	3.48165	2	1.74083	8.37	0.0184
RESIDUOS	1.24816	6	0.208026		
TOTAL (CORREGIDO)	9.07479	11			

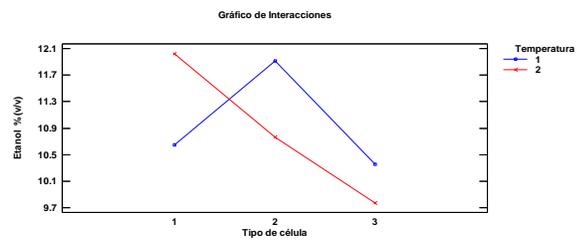
Pruebas de Múltiple Rangos para Etanol % (v/v) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	10.0632	0.228049	X
1	4	11.33	0.228049	X
2	4	11.337	0.228049	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.007	0.789157
01-mar	*	1.26675	0.789157
02-mar	*	1.27375	0.789157

INTERACCIONES



106 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Anexo G: Análisis estadístico para la variable tiempo

Análisis de Varianza para Días - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	117.042	1	117.042	2809	0.0000
B:Tipo de célula	47.5833	2	23.7917	571	0.0000
C:Temperatura	7.04167	1	7.04167	169	0.0000
INTERACCIONES					
AB	14.5833	2	7.29167	175	0.0000
AC	7.04167	1	7.04167	169	0.0000
BC	10.5833	2	5.29167	127	0.0000
ABC	3.58333	2	1.79167	43	0.0000
RESIDUOS	0.5	12	0.0416667		
TOTAL	207.958	23			
(CORREGIDO)					
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Días por Tipo de miel

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	9.58333	0.0589256	X
1	12	14	0.0589256	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	4.41667	0.181568

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Días por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	8	10.5	0.0721688	X
2	8	11.125	0.0721688	X
3	8	13.75	0.0721688	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-----------	------	------------	-------------

01-feb	*	-0.625	0.222375
01-mar	*	-3.25	0.222375
02-mar	*	-2.625	0.222375

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Días por Temperatura

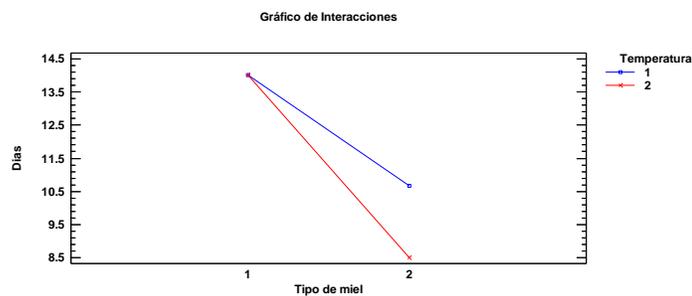
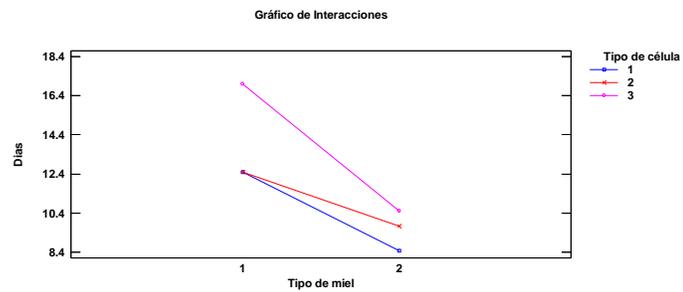
Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	12	11.25	0.0589256	X
1	12	12.3333	0.0589256	X

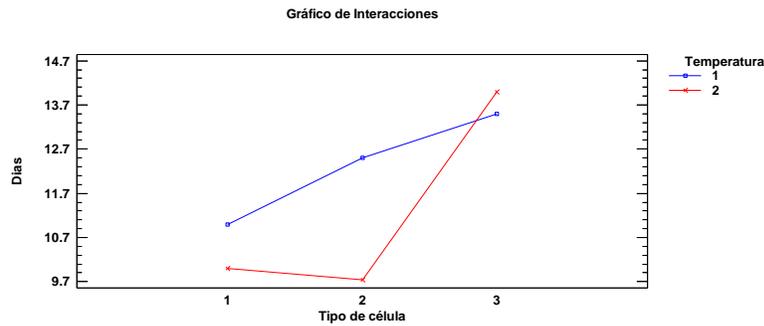
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	1.08333	0.181568

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES



108 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



Estadística para tiempo en fermentación con miel floral

Análisis de Varianza para Días - Suma de Cuadrados

Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	54	2	27		
B:Temperatura	0	1	0		
INTERACCIONES					
AB	6	2	3		
RESIDUOS	0	6	0		
TOTAL (CORREGIDO)	60	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Días

por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	4	12.5	0	X
1	4	12.5	0	X
3	4	17	0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0	0
01-mar	*	-4.5	0
02-mar	*	-4.5	0

* indica una diferencia significativa.

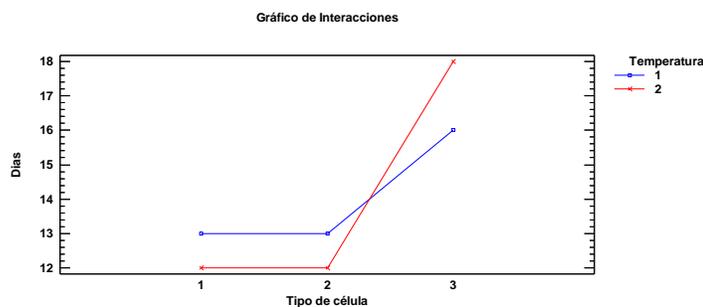
Pruebas de Múltiple Rangos para Días por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	14	0	X
1	6	14	0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0	0

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES

Estadística para tiempo en fermentación con miel de mielato

Análisis de Varianza para Días - Suma de Cuadrados

Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES						
A: Tipo de célula	8.16667		2	4.08333	49	0.0002
B: Temperatura	14.0833		1	14.0833	169	0
INTERACCIONES						
AB	8.16667		2	4.08333	49	0.0002
RESIDUOS	0.5		6	0.0833333		
TOTAL (CORREGIDO)	30.9167		11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Días
por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

110 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	8.5	0.144338	X
2	4	9.75	0.144338	X
3	4	10.5	0.144338	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-1.25	0.499475
01-mar	*	-2	0.499475
02-mar	*	-0.75	0.499475

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Días por Temperatura

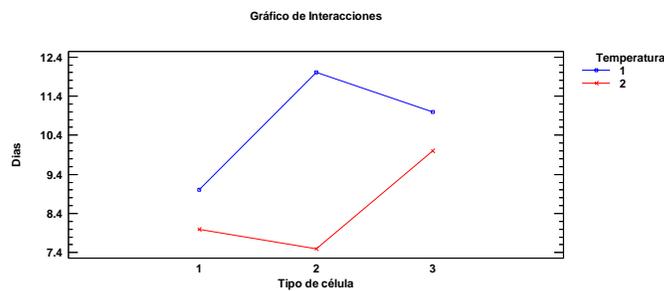
Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	8.5	0.117851	X
1	6	10.6667	0.117851	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	2.16667	0.40782

* indica una diferencia significativa.

INTERACCIONES

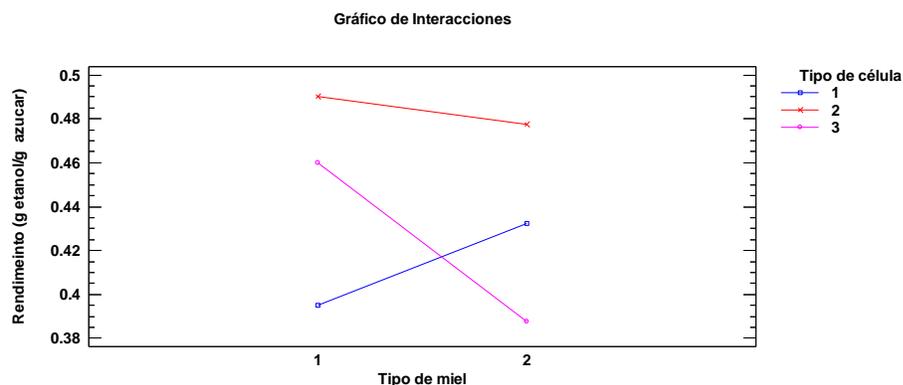


Anexo H: Estadística para la variable rendimiento

Análisis de Varianza para Rendimiento (g etanol/g azúcar) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	0.00150417	1	0.00150417	1.71	0.2154
B:Tipo de célula	0.0229333	2	0.0114667	13.04	0.001
C:Temperatura	0.00220417	1	0.00220417	2.51	0.1393
INTERACCIONES					
AB	0.0121333	2	0.0060667	6.9	0.0101
AC	0.0000375	1	0.0000375	0.04	0.8398
BC	0.00743333	2	0.00371667	4.23	0.0408
ABC	0.0007	2	0.00035	0.4	0.6801
RESIDUOS	0.01055	12	0.00087917		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0574958	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (g etanol/g azúcar) por Tipo de célula					
Método: 95.0 porcentaje LSD					
Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
	1	8	0.41375	0.0104831	X
	3	8	0.42375	0.0104831	X
	2	8	0.48375	0.0104831	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
01-feb	*		-0.07	0.0323018	
01-mar			-0.01	0.0323018	
02-mar	*		0.06	0.0323018	
* indica una diferencia significativa.					

112 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



Rendimiento para miel floral

Análisis de Varianza para Rendimiento (g etanol/g azúcar) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de célula	0.0188667	2	0.00943333	10.11	0.012
B: Temperatura	0.000833333	1	0.000833333	0.89	0.3812
INTERACCIONES					
AB	0.00606667	2	0.00303333	3.25	0.1106
RESIDUOS	0.0056	6	0.000933333		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0313667	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (g etanol/g azúcar) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	0.395	0.0152753	X
3	4	0.46	0.0152753	X
2	4	0.49	0.0152753	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.095	0.0528595
01-mar	*	-0.065	0.0528595
02-mar		0.03	0.0528595

* indica una diferencia significativa.

Rendimiento para miel de mielato

Análisis de Varianza para Rendimiento (g etanol/g azúcar) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.0162	2	0.0081	9.82	0.0128
B:Temperatura	0.00140833	1	0.00140833	1.71	0.2392
INTERACCIONES					
AB	0.00206667	2	0.00103333	1.25	0.3511
RESIDUOS	0.00495	6	0.000825		
TOTAL (CORREGIDO)	0.024625	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Rendimiento (g etanol/g azúcar) por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.3875	0.0143614	X
1	4	0.4325	0.0143614	XX
2	4	0.4775	0.0143614	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		-0.045	0.0496971
01-mar		0.045	0.0496971
02-mar	*	0.09	0.0496971

* indica una diferencia significativa.

114 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Anexo I: Análisis estadístico para variable productividad

Análisis de Varianza para Productividad (g*L)/h - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de miel	0.0876042	1	0.0876042	122.95	0
B: Tipo de célula	0.0643	2	0.03215	45.12	0
C: Temperatura	0.0234375	1	0.0234375	32.89	0.0001
INTERACCIONES					
AB	0.0234333	2	0.0117167	16.44	0.0004
AC	0.0145042	1	0.0145042	20.36	0.0007
BC	0.0151	2	0.00755	10.6	0.0022
ABC	0.00373333	2	0.00186667	2.62	0.1137
RESIDUOS	0.00855	12	0.0007125		
TOTAL (CORREGIDO)	0.240663	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Tipo de miel					
Método: 95.0 porcentaje LSD					
Tipo de miel	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
1	12	0.368333	0.00770552	X	
2	12	0.489167	0.00770552	X	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
01-feb	*	-0.120833	0.0237431		
* indica una diferencia significativa.					

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Tipo de célula					
Método: 95.0 porcentaje LSD					
Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
3	8	0.35625	0.00943729	X	
1	8	0.45625	0.00943729	X	
2	8	0.47375	0.00943729	X	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites		
01-feb		-0.0175	0.0290793		
01-mar	*	0.1	0.0290793		
02-mar	*	0.1175	0.0290793		

* indica una diferencia significativa.

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	0.3975	0.00770552	X
2	12	0.46	0.00770552	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.0625	0.0237431

* indica una diferencia significativa.

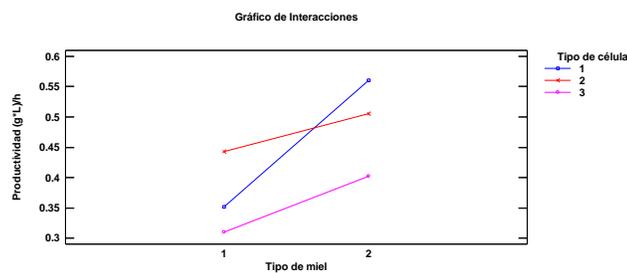
Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

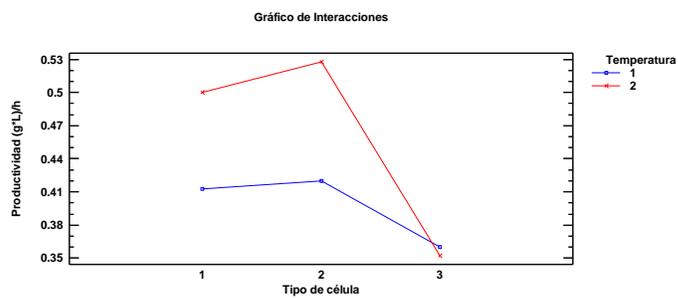
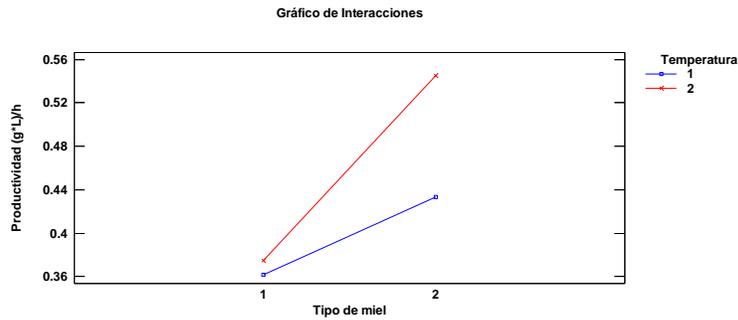
Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	12	0.3975	0.00770552	X
2	12	0.46	0.00770552	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.0625	0.0237431

* indica una diferencia significativa.



116 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



Productividad para miel floral

Análisis de Varianza para Productividad (g*L)/h - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.0366167	2	0.0183083	61.03	0.0001
B:Temperatura	0.00053333	1	0.00053333	1.78	0.2308
INTERACCIONES					
AB	0.00301667	2	0.00150833	5.03	0.0522
RESIDUOS	0.0018	6	0.0003		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0419667	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Tipo de célula

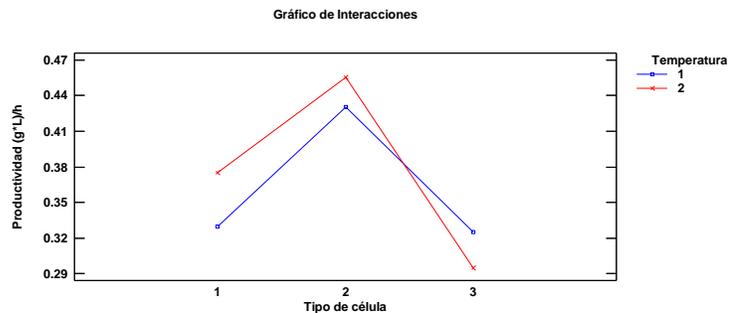
Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.31	0.00866025	X
1	4	0.3525	0.00866025	X
2	4	0.4425	0.00866025	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.09	0.0299685

01-mar	*	0.0425	0.0299685
02-mar	*	0.1325	0.0299685

* indica una diferencia significativa.



Productividad para mielato

Análisis de Varianza para Productividad (g*L)/h - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tipo de célula	0.0511167	2	0.0255583	22.72	0.0016
B: Temperatura	0.0374083	1	0.0374083	33.25	0.0012
INTERACCIONES					
AB	0.0158167	2	0.00790833	7.03	0.0268
RESIDUOS	0.00675	6	0.001125		
TOTAL (CORREGIDO)	0.111092	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Tipo de célula

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tipo de célula	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	4	0.4025	0.0167705	X
2	4	0.505	0.0167705	X
1	4	0.56	0.0167705	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb		0.055	0.0580338
01-mar	*	0.1575	0.0580338
02-mar	*	0.1025	0.0580338

* indica una diferencia significativa.

118 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

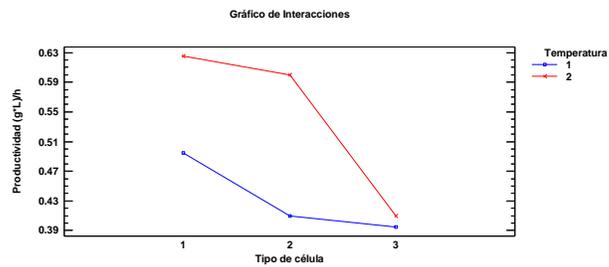
Pruebas de Múltiple Rangos para Productividad (g*L)/h por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	0.433333	0.0136931	X
2	6	0.545	0.0136931	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.111667	0.0473844

* indica una diferencia significativa.



Anexo J: Análisis estadísticos para variable glicerol

Análisis de Varianza para Glicerol (% p/v) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de miel	0.00260417	1	0.00260417	0.62	0.4443
B:Tipo de célula	0.0125083	2	0.00625417	1.49	0.2593
C:Temperatura	0.00570417	1	0.00570417	1.36	0.2634
INTERACCIONES					
AB	0.0267583	2	0.0133792	3.18	0.0725
AC	0.0108375	1	0.0108375	2.58	0.1306
BC	0.00565833	2	0.00282917	0.67	0.5258
RESIDUOS	0.058825	14	0.00420179		
TOTAL (CORREGIDO)	0.122896	23			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Glicerol para miel

Análisis de Varianza para Glicerol (% p/v) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.02375	2	0.011875	2.04	0.2103
B:Temperatura	0.00040833	1	0.00040833	0.07	0.7998
INTERACCIONES					
AB	0.0154167	2	0.00770833	1.33	0.3332
RESIDUOS	0.03485	6	0.00580833		
TOTAL (CORREGIDO)	0.074425	11			
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual					

Glicerol para mielato

Análisis de Varianza para Glicerol (% p/v) - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de célula	0.0155167	2	0.00775833	3.35	0.1055
B:Temperatura	0.0161333	1	0.0161333	6.96	0.0386
INTERACCIONES					
AB	0.00031667	2	0.00015833	0.07	0.9347
RESIDUOS	0.0139	6	0.00231667		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0458667	11			

120 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Glicerol (% p/v) por Temperatura

Método: 95.0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	0.64	0.0196497	X
2	6	0.713333	0.0196497	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
01-feb	*	-0.0733333	0.0679971

* indica una diferencia significativa.

Anexo K: Registro fotográfico

Esferas de carragenina 2 % y 2 % KCl



Esfera de carragenina 3% y 16 % KCl



Montaje mosto de mielato con células inmovilizadas en alginato

122 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



Levadura inmovilizada en esferas de alginato (final del proceso)



Evaluación de estabilidad de esferas de carragenina



Fermentación de miel de mielato con células inmobilizadas en alginato



Proceso de fermentación con miel floral



Proceso de fermentación con miel de mielato



124 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.

Hidromiel elaborado con miel de mielato



Hidromiel elaborada con miel floral



Registro fotográfico panel sensorial



Inmovilización en esferas de carragenina en cámara de flujo laminar

126 Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para obtener una bebida alcohólica tipo vino a partir de miel.



6. Bibliografía

- Acosta, C., 2012. *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. Universidad Nacional de Colombia.
- Alonso, I., Pérez, F., Aguado, M., Egea, J., Atxiaga, M., Estanga, E., *et al.*, 2007. *Guía para la evaluación sensorial de la calidad de los vinos tintos de Rioja Alavesa*,
- Alzate, L.A., 1988. *El ABC del vino y del vinagre*, Medellín: Editorial Lasallista.
- AOAC, 2012. *Official Methods of Analysis (19th ed.)*. G. W. Latimer, ed., Maryland, USA.
- Barik, J., 2014. *Effect of immobilization on production of ethanol using yeast cells*. National Institute of Technology.
- Barrios, C., Principal, J., Sánchez, J. & Guédez, J.C., 2010. Caracterización físico-química y análisis sensorial de un Hidromiel elaborado de manera artesanal. *Zootecnia Tropical*, 28(3), pp.313–319.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P., 2009. Food Chemistry. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9).
- Bely, M., Rinaldi, A. & Dubourdieu, D., 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), pp.507–512.
- Bezbradica, D., Obradovic, B., Leskosek-Cukalovic, I., Bugarski, B. & Nedovic, V., 2007. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. *Process Biochemistry*, 42, pp.1348–1351.
- Blanco, A. & Cuenca, M., 2014. Monitoreo de la Fermentación Alcohólica de Miel de Abejas sin Aguijón Mediante Electroanálisis Monitoring of Alcoholic Fermentation of Stingless Bees Honey by Electroanalysis. , pp.953–955.

- Blanco, A., Cuenca, M., Quicazan, M. & Dávila, M., 2014. Monitoreo de la fermentación de Agraz (*Vaccinium meridionale*) y miel de *Apis mellifera* mediante electroanálisis. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 67(2), pp.955–957.
- Blanco, A., Quicazan, M. & Cuenca, M., 2012. Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. *Vitae*, 19(1), pp.s234 – s236.
- Blanco, A., Torres, A., Palacios, A. & Cuenca, M., 2015. Influencia de la adición de hierbas aromáticas y especias sobre la fermentación alcohólica de miel.
- Bogdanov, S., 2009. *Harmonised Methods of the International Honey Commission. Switzerland.*
- Buzás, Z., Dallmann, K. & Szajáni, B., 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, pp.882–884.
- Caicedo M, L.A., 1996. Estudio comparativo de la generación de CO₂ en fermentaciones con células libres e inmovilizadas de *Zygomonas mobilis*. *revista: ingeniería e investigación*, p.23.
- Cantarelli, C. & Lanzarini, G., 1989. *Biotechnology Applications in Beverage Production* C. Cantarelli & G. Lanzarini, eds., Dordrecht: ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS LTD.
- Caridi, A., Fuda, S., Postorino, S., Russo, M. & Sidari, R., 1999. Selection of *Saccharomyces sensu stricto* for Mead Production. *Food Technology and Biotechnology*, 37(3), pp.203–207.
- Casellas, G.B., 2005. *Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism*. UNIVERSITAT ROVIRA VIRGILI.
- Chen, C.-H., Wu, Y.-L., Lo, D. & Wu, M.-C., 2013. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast inoculations. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), pp.303–308.

- Davila, M., Blanco, J.A. & Quicazán, M.C., 2014. de hidromiel con adición de agraz (*Vaccinium meridionale*). , pp.1–6. Available at: <http://www.enid.unal.edu.co/>.
- van Dijken, J.P. & Scheffers, W.A., 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 32, pp.199–224.
- E.M.T., E.-M., Bryce, C.F.A., Dahhou, B., Sanchez, S., Demain, A.L. & A.R., A., 2012. *Fermentation Microbiology and Biotechnology* Third Edit., CRP PRESS.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M. & Carmen Seijo, M., 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2-3), pp.851–856.
- FAOSTAT, 2012. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). , (© FAO Dirección de Estadística), p.<http://faostat.fao.org/>.
- Fattori, S.B., 2004. *La miel propiedades, composicion y analisis fisico-quimico*, Buenos Aires - Argentina: www.apimondia.org.
- Gamboa, M., 2014. *Estudio e identificación de características de composición y bioactividad propias de miel de mielato de apis mellifera*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gemeiner, P., Nahalkal, J., Vikartovskal, A., Nahalkoval, J., Tomaska, M. & Sturdik, E., 1996. Calcium pectate gel could be a better alternative to calcium alginate gel in multiple applications of immobilized cells. , pp.76–83.
- Ghorbani, F., Younesi, H., Esmaeili, A. & Najafpour, G., 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36, pp.503–509.
- Gombotz, W.R. & Wee, S.F., 2012. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, Supple, pp.194–205.
- Gomes, T., 2010. *Produção de hidromel: efeito das condições de fermentação*. Tesis de

Maestria. Instituto politecnico Escola Superior Agrária de Bragança.

Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Sá Morais, J., Ramalhosa, E., et al., 2010. Mead production: Comparison of different production scales (preliminary results). In Escola Superior Agraria, Institute Politécnico de Braganca, Campus Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-885 Braganca, Portugal, pp. 244–247.

Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J.S., Ramalhosa, E., et al., 2013. Optimization of mead production using Response Surface Methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 59, pp.680–686.

Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Sá Morais, J., Ramalhosa, E., et al., 2011. Mead production improvements after using a factorial design. In *6th International CIGR Technical Symposium - Towards a Sustainable Food Chain: Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management*. Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

Gupta, J.K. & Sharma, R., 2009. Review Paper Production technology and quality characteristics of mead and fruit-honey wines: A review Technology of mead. *Natural Product Radiance*, 8(4), pp.345–355.

Gupta, R.K., Johan, W.R. & Gupta, A., 2014. *Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood*, New York: Springer.

Hernández, C.Y., 2015. *Evaluacion de la producción de hidromiel mediante la adición de diferentes fuentes de nitrogeno y levaduras comerciales*. Universidad Nacional de Colombia.

Holguin Hernandez, M.S., Higuera de rozo, I.M. & Rubio de Ricaurte, B.L., 1998. *Manual de tecnicas de analisis para control de calidad microbiologica de alimentos para consumo humano* INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), ed., Republica de Colombia.

ICMSF, 2015. *Microorganisms in Food 8. Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*, New York: Springer.

- Iconomopoulou, M., Psarianos, K., Kanellaki, M. & Koutinas, A.A., 2002. Low temperature and ambient temperature wine making using freeze dried immobilized cells on gluten pellets. *Process Biochemistry*, 37, pp.707–717.
- ICONTEC, 2009. NTC 4519. *Instituto Colombiano de Normas Tecnicas y Certificación*.
- ICONTEC, 2003. NTC 5113,
- van Iersel, M., Brouwer-Post, E., Rombouts, F. & Abee, T., 2000. Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme and microbial technology*, 26(8), pp.602–607.
- Iglesias, A., Pascoal, A., Choupina, A.B., Carvalho, C.A., Feás, X. & Estevinho, L.M., 2014. Developments in the Fermentation Process and Quality Improvement Strategies for Mead Production. , pp.12577–12590.
- Imeson, A.P., 1997. *Thickening and Gelling Agents for Food* 1st ed., Springer US.
- Jacobson, J.L., 2006. *Practices and Procedures Introduction to Wine Laboratory Practices*, Springer.
- Jiménez, M. V, Zarkovic, G.G., Villena, G.K. & Gutierrez-Correa, M., 2011. Efecto de diametro de esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. , 13(1).
- Jiménez, M., Zarkovic, G., Villena, G.K. & Gutiérrez-correa, M., 2011. Efecto de diámetro de esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. , XIII(1), pp.8–15.
- Kahoun, D., Řezková, S., Veškrnová, K., Královský, J. & Holčapek, M., 2008. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1202, pp.19–33.
- Kamal, M.A. & Klein, P., 2011. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), pp.17–21.

- Katoh, T. & Koguchi, M., 2011. Production and Antioxidative Activity of Mead Made from Various Types of Honey and Black Rice (*Oryza sativa* var. Indica cv. Shiun). *Food Science and ...*, 17(2), p.149.
- Kempka, A. & Mantovani, G., 2013. *Produção de hidromel utilizando méis de diferentes qualidades*.
- King, V. & Zall, R., 1983. Ethanol fermentation of whey using polyacrylamide and kappa-carrageenan entrapped yeasts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 29(5), pp.379–393.
- King, V. & Zall, R.R., 1983. Ethanol fermentation of whey using polyacrylamide and kappa-carrageenan entrapped yeasts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 393(1983), pp.379–393.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R. & Koutinas, A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21(4), pp.377–397.
- Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Kaliafas, A., Kanellaki, M., Marchant, R., et al., 2003. Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chemistry*, 82, pp.353–360.
- Laverde, J., Egea, L., Rodríguez, D. & Peña, J., 2010. *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas.*, Bogota D.C: Ministerio De Agricultura y Desarrollo Rural.
- Lee, D.H., Kang, H.-Y., Lee, Y., Cho, C.-H., Park, I.-T., Kim, H.-D., et al., 2012. Brewing and quality characteristics of Korean honey wine (Mead) with a variety of honey and yeast. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 44(6), pp.736–742.
- Lin, Y. & Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl microbiol Biotechnol*, 69, pp.627–642.
- Lozinsky, V.I., Zubov, A.L. & Titova, E.F., 1997. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as

- matrices for cell immobilization. 2. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(3), pp.182–190.
- Mammarella, E.J., 2001. *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL.
- Mangmang, Z., Zhufeng, L., Zuoqi, L. & Fan, Y., 2012. Study on the Fermentation Techniques of Honey Wine. *Liquor-Making Science & Technology*, (4), pp.95–97.
- McConnell, D. & Schramm, K., 1995. Mead Success: Ingredients, Processes and Techniques. *ZYMURGY Spring*, pp.33 – 39.
- Mendes-Ferreira, A., Cosme, F., Barbosa, C., Falco, V., Inês, A. & Mendes-Faia, A., 2010. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International journal of food microbiology*, 144(1), pp.193–198.
- Mercado, J.A., 1995. *Bebidas Fermentadas*, Bogota D.C: Universidad a distancia Facultad de Ciencias Basicas e Ingenieria.
- Mimmo, T., Marzadori, C., Montecchio, D. & Gessa, C., 2005. Characterisation of Ca- and Al-pectate gels by thermal analysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 340(16), pp.2510–9.
- Ministerio de la Protección Social, 2010. *Resolucion 1057*, Colombia.
- Morales, E.M.A.V.E. & Angelis, D. de F., 2013. Mead features fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (lalvin k1-1116). *African Journal of Biotechnology*, 12(2), pp.199–204.
- Moreno Arribas, M. & Polo, M.C., 2005. Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), pp.265–286.
- Moreno-Arribas, V. & Polo, C., 2010. *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer.

- Navrátil, M., Šturdík, E. & Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, 23, pp.977–982.
- Navrátil, M., Šturdík, E. & Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology letters*, 23, pp.977–982.
- Necas, J. & Bartosikova, L., 2013. Carrageenan : a review. *Veterinarni Medicina*, 58(4), pp.187–205.
- Oliveira, M.E.S., Pantoja, L., Duarte, W.F., Collela, C.F., Valarelli, L.T., Schwan, R.F., et al., 2011. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Research International*, 44(7), pp.2391–2400.
- Park, J.K. & Chang, H.N., 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18, pp.303–319.
- Peinado, R.A., Moreno, J.J., Villalba, J.M., González-Reyes, J.A., Ortega, J.M. & Mauricio, J.C., 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, pp.79–84.
- Pereira, A.P., Dias, T.D., Andrade, J., Ramalhosa, E. & Estevinho, L., 2009. Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp.2057–2063.
- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J., Estevinho, L. & Mendes-Faia, A., 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Science and Technology*, 56, pp.21–30.
- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J.M., Estevinho, L.M. & Mendes-Faia, A., 2013. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. *Food Microbiology*, 33, pp.114–123.
- Phillips, C.R. & Poon, Y.C., 1988. *immobilization of cells*, Springer-Verlag.

- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A. & Russell, I., 1998. Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104, pp.19–31.
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H. & Van Dijken, J.P., 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, pp.1607–1633.
- Puig, A., Bertran, E., Masqué M. C, Vilavella, M., García-Martínez, T., Mauricio, J., et al., 2010. Uso de un nuevo sistema de inmovilización de levaduras en vinificación. Estudio de su reutilización. *www.oiv2010.ge*, pp.1–8.
- Qureshi, N. & Tamhane, D. V, 1986. Applied Microbiology Biotechnology Mead production by continuous series reactors using immobilized yeast cells. , 23, pp.438–439.
- Qureshi, N. & Tamhane, D.V., 1985. Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21, pp.280–281.
- Ramakrishna, S. V & Prakasham, R.S., 2009. Microbial fermentations with immobilized cells. , pp.1–29.
- Ramalhosa, E., Gomes, T., Pereira, A.P., Dias, T. & Estevinho, L.M., 2011. Chapter 4: Mead Production. Tradition Versus Modernity. *Advances in Food and Nutrition Research*, 63, pp.101–118.
- Rattanapan, A., Limtong, S. & Phisalaphong, M., 2007. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy*, 88(12), pp.4400–4404.
- Roldán, A., van Muiswinkel, G.C.J., Lasanta, C., Palacios, V. & Caro, I., 2011. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126, pp.574–582.
- Sankalia, M.G., Mashru, R.C., Sankalia, J.M. & Sutariya, V.B., 2006. Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads:

- Physicochemical characterization and optimization using composite index. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, pp.1–14.
- Sarma, S.J., Verma, M. & Brar, S., 2013. Industrial Fermentation for Production of Alcoholic Beverages. In C. R. Soccol, A. Pandey, & C. Larroche, eds. *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry*. Contemporary Food Engineering. CRC Press, pp. 299–322.
- Senyan, Y., Dan, X. & Li, Z., 2010. Study on Fermentation Techniques of Wine with Korla Pears and Honey. *Diario de la Universidad de Xiaogan*, 6, pp.37–36.
- Shen, N., Moonjai, K.J., Verstrepen, F., Delvaux, F. & Delvaux, R., 2003. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* Induces Changes in the Gene Expression Levels of HSP12, SSA3, and ATF1 During Beer Fermentation. *Journal of the ASBC the science of beer*.
- Simova, S., Atanassov, A., Shishiniov, M. & Bankova, V., 2012. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 134(3), pp.1706–1710.
- Šmogrovičová, D., Nádaský, P., Tandlich, R., Wilhelmi, B.S. & Cambray, G., 2012. Analytical and Aroma Profiles of Slovak and South African Meads. *Czech Journal of Food Science*, 30(3), p.241.
- Srimeena, N., Gunasekaran, S., Murugesan, R. & Muthuraman, M., 2013. Evaluation of antioxidant activity and characterization of Indian rock bee mead. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(4), pp.3185–3190.
- Sroka, P. & Tuszyński, T., 2007. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104, pp.1250–1257.
- Suárez-Lepe, J. & Morata, A., 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), pp.39–50.
- Teramoto, Y., Sato, R. & Ueda, S., 2005. Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine , ogol. , 4(2), pp.160–163.

- TRADEMAP, 2014. Trade statistics for international business development. Available at: disponible en: www.trademap.org.
- Tsakiris, A., Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R. & Banat, I.M., 2004. Immobilization of yeast on dried raisin berries for use in dry white wine-making. *Food Chemistry*, 87(1), pp.11–15.
- Ukpabi, U.J., 2006. Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 6(1), pp.37–41.
- Vairo, M., 1961. Methylene blue solutions for staining dead yeast cells. *Stain Technology*, 36, pp.329–330.
- Valbuena, A.O., 1992. *Contribución a la denominación de origen de la miel de la alcarria*. Complutense de Madrid.
- Varnam, A.H. & Sutherland, J.P., 1994. *Bebidas Tecnología, química y microbiología*, Zaragoza-España: EDITORIAL ACRIBIA S.A.
- Verbelen, P.J., De Schutter, D.P., Delvaux, F., Verstrepen, K.J. & Delvaux, F.R., 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), pp.1515–1525.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx., G., Verachtert., H. & Delvaux., F.R., 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, pp.197–205.
- Watanabe, I., Miyata, N., Ando, A., Shiroma, R., Tokuyasu, K. & Nakamura, T., 2012. Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresource Technology*, 123, pp.695–698.
- Wijffels, R.H., 2001. *Immobilized Cells*, Springer - Verlag Berlin Heidelberg.
- Wintersteen, C.L., Andrae, L.M. & Engeseth, N.J., 2005. Effect of Heat Treatment on

Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Mead. *Journal of Food Science*, 70(2), pp.C119–C126.

Xiao-man, W., Yun-xiang, L., Yong-mei, H., Yuan-xin, W. & Shen, A., 2009. Development on Dry Fermented Mead. *Making licor*, 3.

Zamora, F., 2009. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, eds. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York, pp. 3–26.

Zhang, Y., Ai, Y. qin, Wu, Q., Li, C. fa & Chen, W. xue, 2014. Optimization of fermentation conditions of mead by response surface methodology. *Advanced Materials Research*, 881-883, pp.789 –792.

Zhou, Y., Liu, W., Chen, Q. & Xie, R.M., 1993. A new method of mead (honey wine) production.